

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

Antocianos:

metabolismo y actividad biológica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Hidalgo Jerez

Directoras

Sonia de Pascual-Teresa Fernández
Concepción Sánchez-Moreno González

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



**ANTOCIANOS:
METABOLISMO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

TESIS DOCTORAL

María Hidalgo Jerez

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



**ANTOCIANOS:
METABOLISMO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Trabajo de investigación que presenta María Hidalgo Jerez para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (UCM)

Vº Bueno director:

Vº Bueno director:

Vº Bueno doctorando:

Sonia de Pascual-Teresa Fernández

Concepción Sánchez-Moreno González

María Hidalgo Jerez

Madrid, 2012

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN (ICTAN)

Departamento de Metabolismo y Nutrición



La Dra. **Sonia de Pascual-Teresa Fernández**, Científico Titular del Departamento de Metabolismo y Nutrición del ICTAN, CSIC y la Dra. **Concepción Sánchez-Moreno González**, Científico Titular del Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del ICTAN, CSIC, directoras del trabajo “**Antocianos: Metabolismo y Actividad Biológica**” realizado por **María Hidalgo Jerez**, para optar al título de Doctora, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Madrid, 19 de septiembre de 2012

Dra. Sonia de Pascual-Teresa Fernández

Dra. Concepción Sánchez-Moreno González

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), bajo la dirección de las Dras. Sonia de Pascual-Teresa Fernández y Concepción Sánchez-Moreno González.

Dicho trabajo de investigación se realizó dentro del proyecto del Plan Nacional de I+D (AGL2006-05453), el proyecto de la Comunidad de Madrid de I+D (CCG07-CSIC/AGR-1762 CAM-CSIC) y gracias a la concesión de una beca JAE-Predoctoral (JAEPRe_08_00447) por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (2008/2012) y a la ayuda para estancias breves asociada a la beca JAE-Predoctoral en: Department of Food and Nutritional Sciences, School of Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading, Reading, UK (Abril-Octubre de 2010).

A mis padres,

A mis hermanas,

A Juan.

*“Quién quiera que haya sido el padre de la
enfermedad, una mala dieta fue su madre”*

George Herbert

Parece que fue ayer cuando me incorporé al Instituto del Frío, ahora ICTAN, y ya han pasado más de 5 años. Llegados a este punto del camino me encuentro frente a una hoja en blanco y una copa de vino, para dar ejemplo, y me resulta difícil expresar el agradecimiento que siento a tantas personas que han hecho que la realización de este trabajo sea posible.

En primer lugar, me gustaría agradecer sinceramente a mis directoras, la Dra. Sonia de Pascual-Teresa y la Dra. Concepción Sánchez-Moreno por darme la oportunidad de trabajar junto a ellas y guiarme en el mundo de la investigación. A Sonia por confiar en mí para realizar este trabajo, por aportarme tantos conocimientos y por tu apoyo en momentos como mi presentación en Murcia cuando me temblaba “todo”. A Conchy, por tu experiencia, apoyo incondicional y animarme en todo momento a seguir hasta el final.

Al CSIC por concederme una beca pre-doctoral y darme la oportunidad de descubrir el increíble mundo de la Ciencia.

A Maite, Carlos e Irene que me ofrecisteis vuestra amistad y mejor sonrisa cuando llegué aquí, hicisteis que fuera uno de los mejores años en el centro.

Nunca olvidaré mis comienzos en el mundo de los “celulitas” con J.J., gracias porque nadie me ha vuelto a cantar Alejandro Sanz en la sala de cultivos. También gracias a otros muchos que han pasado por aquí brevemente, pero con los que compartí muchas horas en cultivos o con el HPLC, Dani, Susana, Virginia y Silvia.

A mis antiguos “compis” del “Rincón de los Guays”, Tati, Gonzalo, Belén, Raquel, Ana, Ailén, Bea Solo, Ione... ¡vaya cocktail! Mil gracias por las risas compartidas, han hecho, y siguen haciendo en los desayunos, que una se levante con ganas de ir al “curro”. Tampoco quiero olvidarme de los nuevos compis con los que sigo compartiendo risas y confianzas, Miren, Laura, Lorena, Silvia y especialmente Gerardo, por tu ayuda en cualquier campo, e Ildé porque nuestros “dilemas de tesis” resultaban finalmente siempre algo divertido ¡cuántos suspiros y risas!

Como no dar las gracias a “Evita” con su “holita” mañanero que te alegra el día aunque todo sea gris y por sus consejos del “labo”. A Ana, nunca olvidaré aquellos cursos del doctorado donde conocí a una gran amiga. A Candé, Quca, Bea H., Mauri, Nuria, Clara y la loca de Ruth por vuestra amistad, siempre dispuestos a ir de cañas a la plaza mayor.

A José Manuel, recién llegado al grupo y a quién me hubiera gustado conocer antes. Of course a Kamila, aunque mi inglés no es el mejor nuestra amistad a hecho que nos entendamos a la perfección, como tú siempre dices Thanks a lot!

A los compañeros que conocí durante mi estancia en Reading, Gemma, Adele, Simone, Roberto, Cid, Magda, Inma...especialmente a M^a Jose por tu apoyo profesional y personal. Hiciste que todo fuera una aventura inolvidable.

A Oscar, Javi, Joaquín y P. Pablo por sus entretenidas tertulias a la hora de comer y sus sabios consejos.

Por supuesto, quiero agradecer a la Dra. Marisi Recio, Dra. Beatriz de Pascual-Teresa, Dra. Sonsoles Martín, Dra. "Martita" Ávila, Dr. G. Gibson y Dr. J. Spencer por abrirme las puertas de vuestros laboratorios y brindarme toda la ayuda para que esta memoria vaya hacia adelante.

En definitiva a todo el personal del ICTAN, a la gente de la USTA, Inma y Miguel Ángel por la aportación de vuestros conocimientos, a los informáticos que tantos "cables" me habéis echado, a todo el departamento de Metabolismo y Nutrición por su compañerismo, especialmente con los que he compartido el labo 2205 y la sala de cultivos ¡menos mal que nos mudamos y ya no pasamos tanto calor!

A "todo" San Martín de Pusa porque allí soy capaz de evadirme, desconectar y disfrutar.

Pero a quienes quiero agradecer enormemente esta tesis es a mis padres, "pa" y "ma", GRACIAS por hacerme valer, apoyarme incondicionalmente en los buenos y malos momentos y por darme la oportunidad que vosotros no tuvisteis y hubierais querido, espero no decepcionaros nunca. Gracias "ma" por darme la vida, escuchar todos mis desvelos y aconsejarme lo mejor. Gracias "pa" porque haces lo imposible porque tus hijas sean felices y superemos todos los baches.

A mis hermanas, Marta y Lucía, aunque sois las "peques", sois vosotras quienes me dais los mejores consejos en los malos momentos y me hacéis ver que hay vida más allá de la tesis. Ah! Y a mis "cuñis/as" por estar ahí.

Finalmente, y no por ello menos importante, a ti Juan, porque contigo he compartido todos estos años "en las alegrías y en las penas" y siempre has estado ahí para animarme, GRACIAS por aguantar mi mal humor y haber cedido tu tiempo a la ciencia, prometo recompensarte a partir de ahora. "Sin ti no hubiera tenido fuerzas".

! : : : ! : : : .

RESUMEN

RESUMEN

RESUMEN

Los antocianos representan un importante subgrupo dentro de los flavonoides presentes en la dieta y se encuentran principalmente en bebidas como el vino tinto y en algunas hortalizas y frutas de coloración rojiza como los frutos rojos. Tanto estudios epidemiológicos como ensayos *in vivo* han asociado el consumo de alimentos ricos en antocianos con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, tales efectos no parecen que puedan estar justificados sólo por los antocianos ya que los estudios de biodisponibilidad demuestran bajas concentraciones en plasma y en orina. No obstante, tras el consumo de antocianos se aprecian elevadas cantidades de derivados fenólicos en la circulación.

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido caracterizar los metabolitos de los antocianos que llegan al colon como unos de los posibles responsables de su efecto saludable y establecer los mecanismos moleculares por los cuales los antocianos de la dieta y sus metabolitos previenen la aparición de la placa aterosclerótica, ya sea, por sus propiedades antioxidantes o por vías de señalización inflamatoria.

Inicialmente, con el fin de caracterizar los metabolitos de los antocianos, se utilizó un modelo que simulara la degradación química y la degradación mediada por bacterias intestinales. De esta forma se estableció que tanto la degradación química como la bacteriana, previa ruptura del enlace β -glicosídico, son responsables de liberar al medio ácidos fenólicos provenientes del anillo B del antociano y otros compuestos aromáticos del anillo A. Todos estos compuestos deben tenerse en cuenta cuando se evalúan los efectos saludables de los antocianos. Por ello se realizaron otros ensayos en los que se ponen de manifiesto las propiedades bioactivas por las que, tanto los antocianos como sus metabolitos, ejercen funciones protectoras frente al desarrollo de la aterosclerosis.

Por un lado, simultáneamente a la fermentación microbiana en el colon, los antocianos pueden modular la composición de la microbiota intestinal, así pues cuando se incubaron los antocianos con muestras fecales se apreció un aumento de bacterias consideradas beneficiosas para la salud como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, así como una disminución de aquellas potencialmente perjudiciales como *Clostridium histolyticum*.

Dado que el estrés oxidativo parece jugar un importante papel en el origen de la aterosclerosis, se propuso analizar el efecto de la interacción, en términos de capacidad antioxidante, de varios flavonoides presentes en los alimentos. Los resultados indicaron

que los antocianos pueden interactuar con otros flavonoides y ocasionar efectos sinérgicos o antagónicos que hipotéticamente darán lugar a los efectos antioxidantes globales.

Además, los mecanismos de acción de todos estos compuestos se deben no sólo a la actividad antioxidante ejercida individualmente o como consecuencia de su interacción, sino a la regulación de procesos celulares. Por lo tanto, con el fin de analizar otros parámetros relacionados con la inflamación, se realizaron ensayos celulares con macrófagos y células endoteliales cuyos resultados pusieron de manifiesto que la aplicación al medio de cultivo de distintas concentraciones de los metabolitos de antocianos podrían contribuir a la prevención del desarrollo de la placa ateromatosa mediante la inhibición de la secreción de moléculas inflamatorias implicadas en la formación del ateroma tales como moléculas prooxidantes (NO), citoquinas (TNF- α), moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) y quimioquinas (MCP-1). En este sentido, se analizó *in vitro* uno de los mecanismos clave para frenar la señalización inflamatoria y se observó que los antocianos y ácidos fenólicos ensayados muestran cierta capacidad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), especialmente los antocianos y los ácidos gálico, cafeico y *p*-cumárico, siendo ésta una posible vía de prevención del desarrollo y progresión de la placa de ateroma.

Por último, en este trabajo se demostró la afinidad de algunos antocianos y sus metabolitos como los ácidos gálico y protocatéquico por el receptor estrogénico- α y el receptor estrogénico- β . Se realizó mediante estudios teóricos del modo de unión (*docking*) y ensayos de competición por receptores estrogénicos usando los receptores estrogénicos, α y β , sintetizados *in vitro* y saturados con estradiol marcado que se incubaron con varias concentraciones de los compuestos de interés. Así pues, los efectos beneficiosos de algunos antocianos y sus metabolitos a nivel cardiovascular podrían limitar el desarrollo de la placa ateromatosa debido en parte a su afinidad por receptores estrogénicos.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 POLIFENOLES	9
1.1.1 CLASIFICACIÓN Y FUENTES DIETÉTICAS.....	9
1.1.1.1 Ácidos fenólicos.....	10
1.1.1.2 Alcoholes fenólicos	11
1.1.1.3 Estilbenos.....	11
1.1.1.4 Lignanos.....	11
1.1.1.5 Flavonoides	11
1.1.1.5.1 Flavonoles	12
1.1.1.5.2 Flavonas.....	12
1.1.1.5.3 Flavanonas	13
1.1.1.5.4 Flavanoles	13
1.1.1.5.5 Isoflavonas	14
1.1.1.5.6 Calconas.....	14
1.1.1.5.7 Antocianos.....	15
1.1.1.5.7.1 Estructura química	15
1.1.1.5.7.2 Estabilidad	16
1.1.1.5.7.3 Fuentes dietéticas	18
1.2 INGESTA DE ANTOCIANOS Y OTROS POLIFENOLES	19
1.3 ANÁLISIS DE ANTOCIANOS	20
1.3.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	20
1.3.2 SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN	21
1.3.3 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	22
1.4 BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE ANTOCIANOS	24
1.4.1 PAPEL DE LA FLORA COLÓNICA EN EL METABOLISMO	29
1.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ANTOCIANOS	30
1.5.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANOS.....	32
1.5.1.1 Estrés oxidativo.....	32
1.5.1.2 Capacidad antioxidante	33
1.5.1.3 Métodos para evaluar la actividad antioxidante.....	33
1.5.1.4 Actividad antioxidante de antocianos y otros fenoles	37
1.5.2 CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE ANTOCIANOS.....	39
1.5.2.1 Inflamación	39

1.5.2.2	Estrés oxidativo e inflamación en el origen de la aterosclerosis	40
1.5.2.3	Actividad antiinflamatoria de antocianos	41
1.5.3	PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR POR ANTOCIANOS	42
1.5.3.1	Efecto cardioprotector mediado por receptores estrogénicos.....	43
1.5.3.2	Actividad estrogénica de antocianos.....	44
1.6	IMPLICACIÓN DE LAS BACTERIAS COLÓNICAS EN LA SALUD	45
1.6.1	MODULACIÓN BACTERIANA MEDIADA POR ANTOCIANOS.....	48
2	HIPÓTESIS	51
3	OBJETIVOS	55
4	MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.1	EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS Y SUS METABOLITOS	61
4.1.1	EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE MALVIDINA-3-GLUCÓSIDO.....	61
4.1.2	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS Y SUS METABOLITOS	61
4.2	PROPIEDADES BIOACTIVAS	63
4.2.1	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	63
4.2.1.1	Capacidad de reducción férrica (FRAP)	63
4.2.1.2	Secuestro del radical DPPH•.....	64
4.2.2	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA)	65
4.2.3	ENSAYO COMPETITIVO DE UNIÓN A ER- α y ER- β	66
4.2.4	DETERMINACIÓN DEL MODO DE UNIÓN A ER- α y ER- β : ESTUDIO “DOCKING”	66
4.3	ENSAYOS CON BACTERIAS INTESTINALES	67
4.3.1	ENSAYOS CON CEPAS PURAS DE BACTERIAS INTESTINALES	67
4.3.1.1	Obtención de concentrados de células enteras o extractos libres de células bacterianas	67
4.3.1.2	Determinación de la actividad β -glucosidasa en bacterias	68
4.3.1.3	Degradación química y bacteriana de antocianos <i>in vitro</i>	68
4.3.2	ENSAYOS CON BACTERIAS INTESTINALES DE MUESTRAS FECALES.....	69
4.3.2.1	Inoculación de muestras fecales con sustratos en cultivo fermentativo	69
4.3.2.2	Recuento de bacterias.....	70

4.4	ENSAYOS CON CULTIVOS CELULARES.....	71
4.4.1	MONOCITO-MACRÓFAGO DE RATÓN (RAW 264.7).....	71
4.4.2	CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS (EA.hy 926)	72
4.4.3	VIABILIDAD CELULAR POR EL MÉTODO ROJO NEUTRO	72
4.4.4	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO.....	72
4.4.5	DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE TNF- α	73
4.4.6	DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMIOTÁCTICA DE MONOCITOS-1 (MCP-1) Y LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR (ICAM-1 Y VCAM-1).....	73
4.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
5	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	75
	ARTÍCULO 1: “BIOCONVERSION OF ANTHOCYANINS GLYCOSIDES BY BIFIDOBACTERIA AND LACTOBACILLUS”	77
	ARTÍCULO 2: “FLAVONOID-FLAVONOID INTERACTION AND ITS EFFECT ON THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY”	89
	ARTÍCULO 3: “POTENTIAL ANTI-INFLAMMATORY, ANTI-ADHESIVE, ANTI/ESTROGENIC AND ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORY ACTIVITIES OF ANTHOCYANINS AND THEIR GUT METABOLITES”	97
	ARTÍCULO 4: “METABOLISM OF ANTHOCYANINS BY HUMAN GUT MICROFLORA AND THEIR INFLUENCE ON GUT BACTERIAL GROWTH”	111
6	DISCUSIÓN GENERAL.....	123
7	CONCLUSIONES	145
8	BIBLIOGRAFÍA	149



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

¹O₂: Oxígeno singlete

AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropano) diclorhidrato

ABTS: Ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

ANOVA: Análisis de varianza

API: Ionización a presión atmosférica

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

BSA: Albúmina sérica bovina

CAMs: Moléculas de adhesión celular

CE: Electroforesis capilar

CID: Disociación inducida por colisión

C_{máx}: Concentración máxima plasmática

COX: Ciclooxygenasa

DAD: Detección por diodos

DAPI: Diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMPD: N,N-dimetil-p-fenilendiamina

DMPO: N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina

DMSO: Dimetil sulfóxido

DO: Densidad óptica

DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo

ECA: Enzima convertidora de la angiotensina

ECV: Enfermedad cardiovascular

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

eNO: Enzima nitrato sintasa endotelial

ENOS: Especies reactivas de nitrógeno

EROS: Especies reactivas de oxígeno

ER- α : Receptor estrogénico- α

ER- β : Receptor estrogénico- β

ESI: Ionización por electroespray

ESR: Resonancia del espín electrónico ("Electron Spin Resonance")

FBS: Suero fetal bovino

FISH: Hibridación fluorescente *in situ* ("Fluorescent In Situ Hybridization")

FLC: Fotoquimioluminiscencia
FOS: Fructooligosacáridos
FRAP: Capacidad de reducción férrica ("Ferric Reducing Antioxidant Power")
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HDL: Lipoproteína de alta densidad
HPCPC: Cromatografía de partición centrífuga de alta eficacia
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
HSCC: Cromatografía en contracorriente de alta velocidad
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1
Ig A: Inmunoglobulina A
IL-1: Interleuquina-1
IL-1 β : Interleuquina-1 β
INE: Instituto Nacional de Estadística
INF- γ : Interferón gamma
iNO: Enzima nitrato sintasa inducible
I κ B: Proteína inhibidora del elemento kappa B
LBD: Dominio de unión al ligando
LC-MS: Cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas
LDL: Lipoproteína de baja densidad
LDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada
LPS: Lipopolisacárido
m/z: Relación masa/carga
MAO: Monoamino oxidasa
MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MS: Espectrometría de masas
NADPH oxidasa: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappa B
nNO: Enzima nitrato sintasa neuronal
NO⁻: Anión nitroxilo
NO[•]: Radical óxido nítrico
NO₂⁻: Nitrito
NO₂[•]: Dióxido de nitrógeno
NO₃⁻: Nitrato
NOs: Óxido nítrico sintasa
O₂^{•-}: Anión superóxido
OH[•]: Radical hidroxilo
OMS: Organización Mundial de la Salud
ONOO⁻: Peroxinitrito

- ORAC:** Capacidad de captación de radicales oxigenados (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”)
- PBS:** Tampón fosfato salino
- PVP:** Polivinilpirrolidona
- RMN:** Resonancia magnética nuclear
- RMSD:** Desviación media de la raíz cuadrada (“Root Mean Square Deviation”)
- ROO[•]:** Radical peroxilo
- t_{1/2}:** Semivida de eliminación plasmática
- TEAC:** Capacidad antioxidante equivalente a trolox (“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”)
- TNF- α :** Factor de necrosis tumoral- α
- TOF:** Tiempo de vuelo (“Time Of Flight”)
- TOSC:** Capacidad secuestradora de radicales de oxígeno totales (“Total Oxyradical Scavenging Capacity”)
- TPTZ:** 2,4,6-tripiridil-S-triazina
- TRAP:** Potencial de captación total de radicales (“Total Radical-trapping Antioxidant Parameter”)
- UI:** Unidad Internacional
- Uma:** Unidad de masa atómica unificada
- UPLC:** Cromatografía líquida de ultra alta eficacia
- UV-Vis:** Ultravioleta-Visible
- v/v:** Volumen/volumen
- VCAM-1:** Molécula vascular-celular 1
- XO:** Xantina oxidasa

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

1 INTRODUCCIÓN

1.1 POLIFENOLES

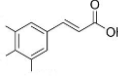
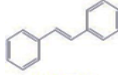
Los polifenoles son un extenso grupo de fitoquímicos ampliamente distribuidos como metabolitos secundarios en el reino vegetal contribuyendo a su morfología y crecimiento. Además desempeñan funciones protectoras frente al ataque de patógenos y como pigmentos que atraen a los polinizadores. Los compuestos fenólicos se caracterizan por sus propiedades sensoriales y nutritivas. Durante décadas, los polifenoles han tenido un gran interés en la industria por sus diversas aplicaciones (aditivos, suplementos, cosméticos)¹. En los últimos años, los polifenoles han cobrado importancia como componentes dietéticos no esenciales para la vida, pero con actividad biológica relacionada con efectos positivos en la salud. Recientemente su interés se focaliza en el papel de la prevención de varias enfermedades asociadas a estrés oxidativo como cáncer, enfermedad cardiovascular (ECV) o neurodegenerativa²⁻⁴. Además, los polifenoles son capaces de modular la actividad enzimática y los receptores celulares⁵.

1.1.1 *CLASIFICACIÓN Y FUENTES DIETÉTICAS*

Los compuestos fenólicos incluyen desde compuestos con un solo anillo fenólico en su estructura como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados.

Actualmente se conocen 8000 compuestos fenólicos diferentes distribuidos en los órganos de las plantas. Generalmente la estructura básica del esqueleto fenólico posee anillos aromáticos con uno o más sustituyentes hidroxilo y dobles enlaces conjugados que les confieren sus propiedades antioxidantes. Los polifenoles pueden clasificarse según su estructura química en ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos, lignanos y flavonoides (**Tabla 1.1**) dependiendo del número de anillos fenólicos que constituyen la molécula y de los sustituyentes que se unen a estos anillos.

Tabla 1.1. Estructura básica de compuestos fenólicos.

Esqueleto	Clasificación	Estructura básica
C ₆ -C ₁	Ácido hidroxibenzoico (ácido fenólico)	
C ₆ -C ₃	Ácido hidroxicinámico (ácido fenólico)	
C ₆ -C ₂	Alcohol fenólico	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbeno	
C ₆ -C ₃	Lignano	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoide	

1.1.1.1 ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos poseen en su estructura un sólo anillo aromático con uno ó más grupos hidroxilo. En la naturaleza no sólo aparecen libres sino que también están conjugados con azúcares, ácidos orgánicos u otros polímeros. Estos compuestos se dividen en dos subclases: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico.

Dentro de los ácidos hidroxibenzoicos, los principales representantes son el ácido gálico, siríngico, protocatéquico y vanílicico. Su contenido en plantas comestibles es bajo excepto en rábanos, cebollas, vino y ciertos frutos rojos como en moras con un contenido de 270 mg/Kg de peso fresco o en frambuesa cuyo contenido es hasta de 100 mg/Kg de peso fresco de ácido protocatéquico⁶. Además las hojas de té poseen un contenido en ácido gálico de 4,5 g/Kg de peso fresco⁷.

En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos, su presencia en la naturaleza es mayor que la de los benzoicos siendo las principales fuentes las legumbres, los cereales, el cacao, la fruta, el aceite, las hierbas, los vegetales, las nueces y las bebidas como el café, la cerveza ó el vino. Principalmente son los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Por ejemplo, una taza de café contiene entre 70 y 350 mg de ácido cafeico⁸.

Aunque la ingesta diaria de ácidos fenólicos totales provenientes de la naturaleza no excede los 100 mg/día, las bacterias del colon pueden llevar a cabo reacciones de transformación a partir de antocianos, proantocianidinas, flavanonas, flavonoles, taninos e isoflavonas que dan lugar a metabolitos fenólicos, siendo el colon una fuente potencial de ácidos fenólicos⁹.

1.1.1.2 ALCOHOLES FENÓLICOS

El grupo de alcoholes fenólicos está representado por tirosol e hidroxitirosol, los cuales se encuentran principalmente en el aceite de oliva extra virgen (40,2 y 3,8 mg/Kg, respectivamente) y también en bebidas como el vino^{10,11}.

1.1.1.3 ESTILBENOS

Los estilbenos son poco abundantes en la dieta humana, el principal representante es el resveratrol, cuya fuente mayoritaria es la piel de uva tinta (50-100 g/Kg de peso fresco) lo que contribuye a su alta concentración en el vino tinto y el zumo de uva, donde se alcanza hasta 7 mg de aglicón/L y 15 mg de glicósido (piceido)/L¹².

1.1.1.4 LIGNANOS

La principal fuente son las semillas de lino, aunque también se encuentran trazas en cereales, granos, frutas y ciertos vegetales. En España ha sido estimado el consumo de lignanos en 0,76 mg/día¹³.

1.1.1.5 FLAVONOIDES

Los flavonoides son el grupo mayoritario dentro de los compuestos fenólicos. El primer flavonoide fue identificado en 1930 por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Szent-Györgyi quien aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina. Originalmente se les llamó “vitamina P”, pero finalmente el término se descartó¹⁴.

Actualmente se conocen unos 5000 flavonoides ubicuos en frutas y verduras¹⁵, así como en sus derivados, vino, zumo o cerveza, entre otros. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA por la ruta del sikimato. Su esqueleto básico posee 15 átomos de carbono que consta de dos anillos fenilo (anillo A y B) unidos por un esqueleto de 3 átomos de carbono, estructura C6-C3-C6 que en la mayoría de los casos forma un anillo heterocíclico (anillo C) (**Figura 1.1**).

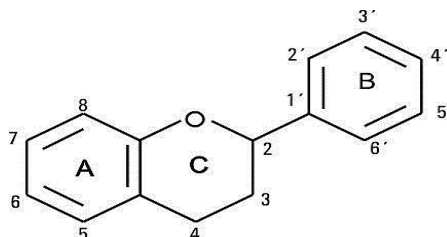


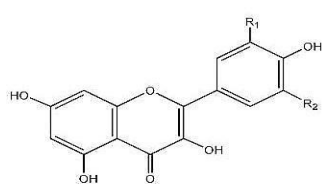
Figura 1.1. Estructura básica de un flavonoide.

En función del estado de oxidación de la cadena de átomos de carbono, los flavonoides se clasifican en flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas, calconas y antocianidinas. A su vez éstos se dividen en sub-clases dependiendo de los sustituyentes en el anillo B y por la sustitución en los diferentes hidroxilos de la molécula.

1.1.1.5.1 Flavonoles

Son los flavonoides más ubicuos en los alimentos, principalmente representados por quercetina, kaempferol y miricetina. Se caracterizan por una insaturación entre los carbonos C2 y C3 del anillo C y se diferencian entre ellos en los sustituyentes del anillo B (**Figura 1.2**). La mayoría se encuentran en la naturaleza glicosilados y/o acilados en la posición 3 del anillo C, pero también pueden aparecer en la posición 5, 7, 4', 3' y 5'.

Los flavonoles están presentes en baja concentración (15-30 mg/Kg de peso fresco)¹⁶. Las principales fuentes son la cebolla, la col, el brócoli, los arándanos y el vino tinto.

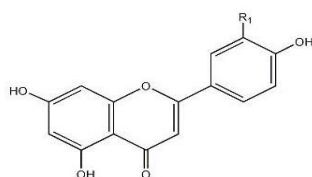


FLAVONOL	R ₁	R ₂
Miricetina	OH	OH
Quercetina	OH	H
Kaempferol	H	H

Figura 1.2. Estructura de los principales flavonoles.

1.1.1.5.2 Flavonas

Las flavonas como la luteína y la apigenina poseen una insaturación entre los carbonos C2 y C3 del anillo C, al igual que los flavonoles, pero carecen del grupo hidroxilo en posición 3 de ese anillo (**Figura 1.3**). La mayoría están glicosiladas en posición 7. Las flavonas son mucho menos comunes en frutas y vegetales. La fuente más importante dentro de los alimentos son el perejil y el apio. Además la piel de los cítricos posee importantes cantidades de flavonas polimetoxiladas⁶.



FLAVONA	R ₁
Luteolina	OH
Apigenina	H

Figura 1.3. Estructura de las principales flavonas.

1.1.1.5.3 Flavanonas

Poseen una estructura no plana y tienen un centro quiral en el carbono C2 (**Figura 1.4**). Los cítricos son los alimentos más ricos en este grupo de flavonoides, aunque también hay en tomates y ciertas hierbas aromáticas como la menta. El principal aglicón en pomelo es la naringenina, en naranja la hesperetina y en limón el eriodictiol. El zumo de naranja contiene entre 200 y 600 mg de hesperidina/L y un único vaso de zumo de naranja entre 40 y 140 mg de flavanonas glicosiladas¹⁷.

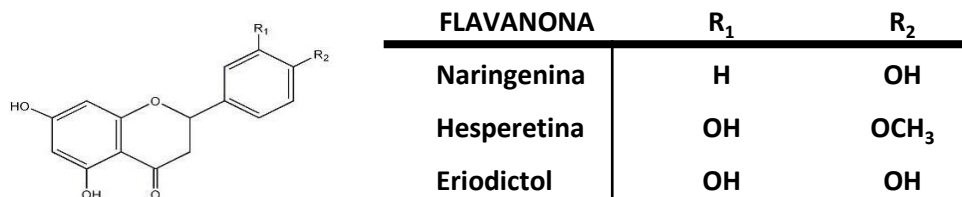


Figura 1.4. Estructura de las principales flavanonas.

1.1.1.5.4 Flavanoles

Su conformación es no planar debido a su saturación en el carbono C3, además debido a los dos carbonos quirales en posiciones 2 y 3 dan lugar a dos derivados trans: catequina o galocatequina que a su vez dan lugar a sus correspondientes isómeros cis, donde se antepone el prefijo epi (epicatequina y epigalocatequina) (**Figura 1.5**).

Los flavanoles existen en la naturaleza como monómeros o formando polímeros llamados proantocianidinas ó taninos condensados. Éstos pueden dar lugar a antocianidinas por calentamiento. Generalmente se encuentran en la naturaleza como aglicona, pero también pueden estar metilados, glicosilados o esterificados.

Para la formación de las proantocianidinas, los monómeros se unen mediante enlaces interflavánicos usualmente entre el carbono 4 del anillo C de la subunidad superior y el 6 de la inferior.

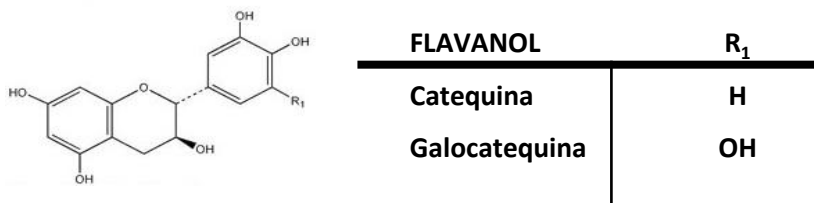


Figura 1.5. Estructura de los principales flavanoles.

La catequina se encuentra principalmente en frutas como albaricoque (250 mg/Kg de fruta fresca) ó en vino tinto (300 mg/L) y chocolate (610 mg/L), pero el mayor contenido es el del té verde (hasta 800 mg/L)^{18, 8}. La presencia de galocatequina y epigallocatequina sólo es relevante en legumbres, granada, uvas, vino, cerveza, té y la mayoría de las bayas^{19, 20}. Con respecto a las procianidinas, es difícil establecer el contenido en los alimentos debido a sus estructuras y pesos moleculares. Estos compuestos son los responsables de la astringencia de ciertas frutas (uvas, melocotones, caquis, bayas) y bebidas (vino, cerveza, sidra, té) o del amargor del cacao²¹.

1.1.1.5.5 Isoflavonas

Las isoflavonas tienen el anillo B unido al carbono C3 en lugar de al carbono C2 y su estructura es similar a la de los estrógenos (**Figura 1.6**). Los principales representantes son genisteína, daidzeína y gliciteína. Su mayor fuente son las legumbres, principalmente la soja cuyo contenido es de 580-3800 mg isoflavona/Kg de peso fresco²².

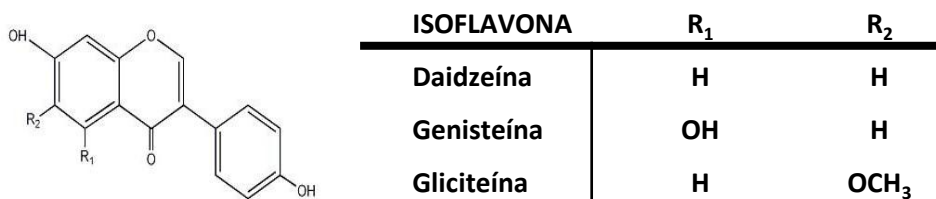


Figura 1.6. Estructura de las principales isoflavonas.

1.1.1.5.6 Calconas

Las calconas son el grupo más limitado dentro de los flavonoides. Su estructura es también C6-C3-C6, pero carece del anillo heterocíclico central (**Figura 1.7**). La isomerización específica de calconas a flavonas es reversible.

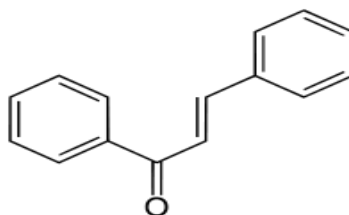


Figura 1.7. Estructura de una calcona.

1.1.1.5.7 Antocianos

Los antocianos son pigmentos que están disueltos en la savia vacuolar de los tejidos epidérmicos de flores y frutas donde confieren una gama de colores como el rojo, púrpura o azul. Por ello, el término antociano deriva de las palabras griegas: *antho* que significa flor y *kyanos* que significa azul oscuro. Como son pigmentos, en las flores son capaces de atraer a los insectos para llevar a cabo la polinización y en los frutos a otros animales para dispersar la semilla. Además, tienen funciones fotoprotectoras, antioxidantes y de defensa de la planta como otros polifenoles²³.

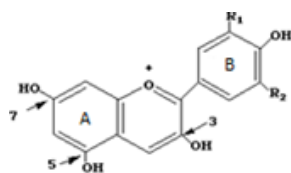
Se denomina antociano a los glicósidos de las antocianidinas (aglicón), pero es relativamente frecuente utilizar el término antociano englobando tanto la forma glicosilada de la antocianidina como la propia antocianidina.

1.1.1.5.7.1 Estructura química

Como miembro de la familia de los flavonoides posee un esqueleto básico C6-C3-C6. En la naturaleza, es casi imposible encontrar antocianidinas debido a su baja estabilidad, sin embargo predominan los antocianos formando heterósidos, cuyo aglicón, derivado del ion flavilio o fenil-2-benzopirilio, está hidroxilado en las posiciones 3, 5 y 7 y metoxilado en diferentes posiciones²⁴. El aglicón está unido a una o varias moléculas de azúcar, las cuales pueden estar aciladas con diferentes ácidos orgánicos. Los hidroxilos y azúcares presentes en la molécula le confieren la propiedad de ser solubles en agua, metanol y etanol. Los azúcares más habituales unidos a las antocianidinas son la glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y fructosa. Además, son frecuentes los disacáridos como rutinosa, soforosa y sambubiosa o los trisacáridos como 2-xilosilrutinosa y glucurosilrutinosa. Los ácidos que pueden unirse a la molécula son los hidroxicinámicos, hidroxibenzoicos, acético y algunos acilados alifáticos dicarboxílicos, como el málico, malónico, oxálico y succínico.

El antociano es un híbrido de resonancia, donde la carga positiva está deslocalizada por todo el heterociclo aromático, dando lugar a un catión oxonio heteroaromático, en el que la mayor densidad relativa de carga positiva se localiza en los carbonos C2 y C4²⁵.

Hay unas 17 antocianidinas identificadas en la naturaleza, de las cuales seis, pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina están ampliamente distribuidas en los alimentos²⁶. Su clasificación depende del número y posición de los grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B (**Figura 1.8**).



ANTOCIANIDINAS	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 1.8. Estructura de las principales antocianidina.

1.1.1.5.7.2 Estabilidad

La estabilidad de los antocianos aumenta según lo hace el número de metoxilos en el anillo B y disminuye con el número de hidroxilos. Teniendo esta característica en cuenta, la malvidina es la más estable y la delfinidina la que menos estabilidad presenta. La glicosilación y acilación también les confieren estabilidad, así como el medio ácido.

La relativa facilidad de desprotonización de los grupos OH en la posición 4' y 7 contribuye al cambio de color de la molécula. Así, en disolución acuosa, los antocianos pueden existir hasta en ocho formas dependiendo del pH, la temperatura y el tiempo²⁷. A pH bajo (2) los antocianos se encuentran en forma de catión flavilio (AH⁺) de color rojo, que es la mayoritaria y más estable. Cuando uno de estos hidroxilos pierde un protón, debido al aumento de pH a 4, se producen las bases quinoidales AH (Figura 1.9) de coloración azulada. A pH cercano a la neutralidad, una segunda desprotonización da lugar a la formación de bases aniónicas quinoidales (A⁻) y neutras con otro tono azul en el espectro de absorción. Estas transferencias de protones ocurren muy rápido en medio acuoso, pudiendo coexistir más de una forma²⁸.

Por otro lado, el catión flavilio a pH entre 3 y 6, es susceptible al ataque nucleofílico del agua en las posiciones defectuosas de carga 2 y/o 4, lo que resulta en una pérdida de color y la formación de pseudobases carbinol incoloras²⁸. En disoluciones ligeramente ácidas o neutras, al aumentar la temperatura, la pseudobase carbinol se puede transformar en una calcona mediante la apertura del anillo. Las calconas pueden ser neutras e incoloras o estar como formas ionizadas con coloración amarilla, las formas neutras pueden ser a su vez *cis* y *trans*. Las formas *cis* pueden revertir al catión flavilio al disminuir el pH, sin embargo, se cree que la transformación es irreversible en el caso de *trans*. Las estructuras tipo calcona son más frecuentes con la falta de sustituyentes en el heterociclo, mientras que los grupos metoxilo en posición 4 o de un azúcar en posición 3 reducen la proporción en el equilibrio²⁵.

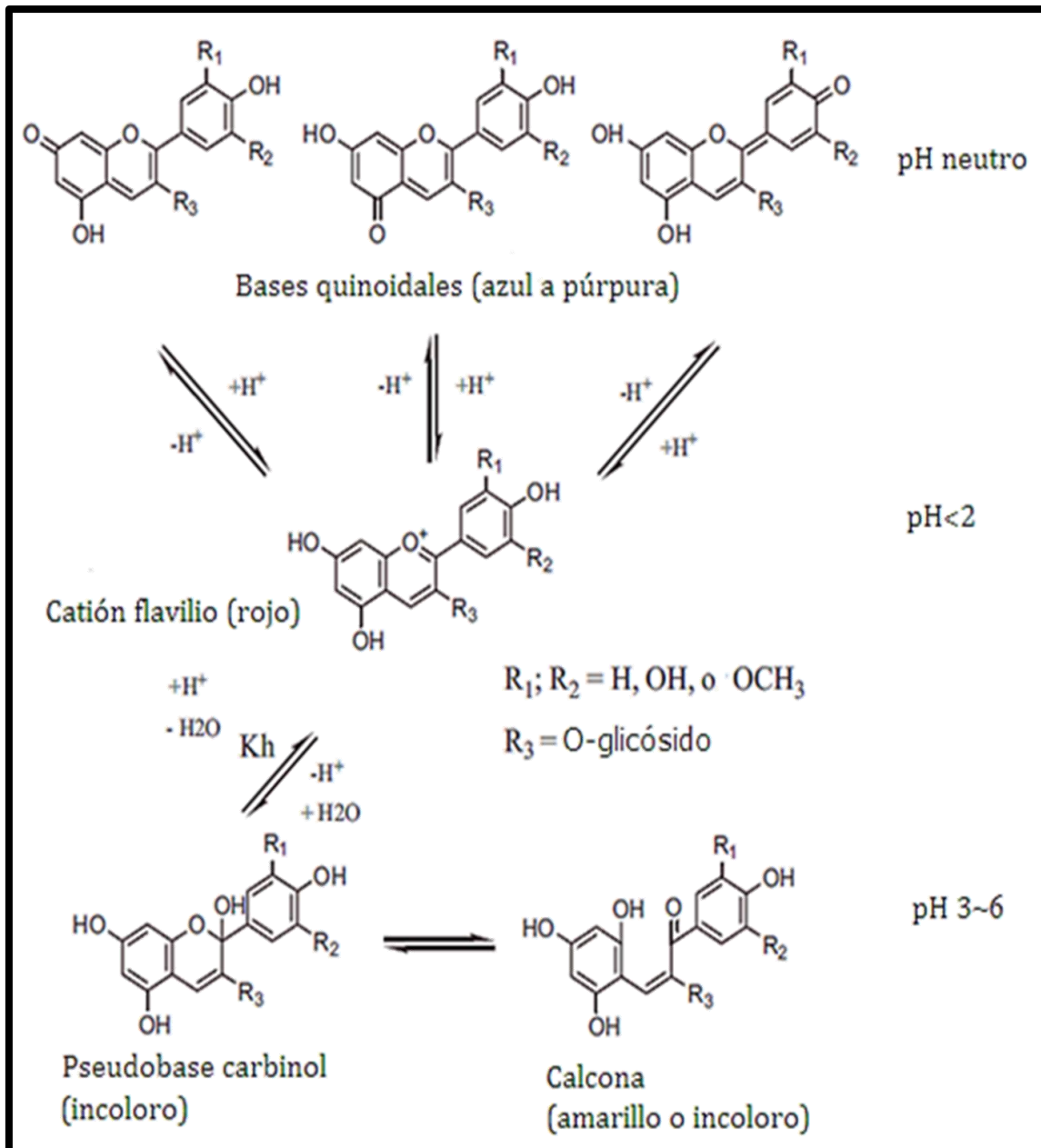


Figura 1.9 Transformaciones estructurales de los antocianos en disolución acuosa (Fuente: Houbiers et al., 1998²⁹).

Además, los antocianos son considerablemente inestables y fácilmente oxidables siendo también influenciados por la temperatura, la luz, la presencia de bisulfitos, ácido ascórbico, metales y otros flavonoides.

1.1.1.5.7.3 *Fuentes dietéticas*

En la dieta humana, los antocianos están principalmente presentes en bebidas como el vino tinto y en alimentos de coloración rojiza como ciertos cereales, vegetales y muy abundantemente en frutas rojas como bayas y la uva tinta.

El contenido en antocianos es proporcional a la intensidad de color de los alimentos alcanzando valores de hasta 2-4 g/Kg de peso fresco en moras o grosellas. Estos valores dependen de la maduración del fruto. En el caso del vino tinto, la concentración varía entre 164-350 mg/L hasta alcanzar un valor de 500 mg/L en vinos jóvenes (**Tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Contenido de antocianos en alimentos.

Alimento	Contenido (mg/100g)(mg/L)	Referencia
Nectarina	2,4	30
Melocotón	4,2	30
Lechuga	2,2-5,2	30, 31
Mosto	5,9	30
Pera	5-10	32
Grosella roja	22	30
Ciruela roja	2-25	31
Grosella espinosa	2-43,3	31, 33
Alubia pinta	24,1-44,5	34
Cebolla roja	23,3-48,5	31, 35
Baya de Goji	49,4	36
Fresas	19-55	37
Manzana roja	0-60	30, 38
Berenjena	8-85	30, 31
Arándano rojo	67-140	30, 31
Rábano rojo	100-154	31, 39
Ruibarbo	4-200	30
Aceituna negra	42-228	32
Zumo de granada	15-252	40
Lombarda	322	31
Mora	82,5-325,9	41
Vino tinto	164-350	42, 43
Arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	61,8-438	44-46
Cereza	2-450	32, 47
Grosella	130-476	31
Arroz negro	10-493	48
Frambuesa	20-687	31, 41
Uva tinta	30-750	49
Arándano (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	300-1017	30, 32, 46
Fruto de aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>)	410-1480	30, 31
Maiz rojo	1642	50
Baya de sauco	664-1816	51

(Adaptado de de Pascual-Teresa et al., 2010⁵²)

Dentro de los seis antocianos más frecuentemente encontrados en los alimentos, la cianidina es el que se encuentra en mayor cantidad (50%) en los alimentos, seguido de pelargonidina (12%), peonidina (12%), delphinidina (12%), petunidina (7%) y malvidina (7%). Sin embargo, los glicósidos de malvidina son los mayoritarios en vino tinto³².

1.2 INGESTA DE ANTOCIANOS Y OTROS POLIFENOLES

La estimación de la ingesta media de polifenoles conlleva una gran dificultad debido no sólo a la complejidad de los compuestos y a los diferentes métodos analíticos, sino a la gran variabilidad individual de la ingesta, así como al diferente consumo entre países.

En 1976, Kuhnau⁵³ calculó como primera estimación de la ingesta dietética de flavonoides en Estados Unidos alrededor de 1g/día. Más recientemente, Pérez-Jiménez *et al.*⁵⁴ han estimado un consumo total de polifenoles en la población francesa de 1.193 mg/día (820 mg/día como equivalente de aglicones) constituido principalmente por ácidos hidroxicinámicos (50%) y proantocianidinas (19%), seguido de catequinas (8%), antocianos (5%) y flavonoles (4%) y en menor proporción se encuentran los ácidos hidroxibenzoicos, las flavonas, flavanonas, isoflavonas, estilbenos y lignanos.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el consumo de ácidos hidroxicinámicos depende de la ingesta de café, alcanzándose valores de 500-800 mg/día, mientras que personas cuyo consumo de café, frutas y vegetales es bajo ingieren unos 25 mg/día⁵⁵. Por otro lado, el consumo de ácidos hidroxibenzoicos es mucho menor, estimándose su consumo en la población francesa alrededor de 41 mg/día⁵⁴. El té y el vino tinto contribuyen con 20 y 6 mg/día, respectivamente de ácido gálico⁵⁴.

Los primeros datos sobre la ingesta diaria de antocianos totales estimaron un consumo de 215 mg/día en verano y 180 mg/día en invierno⁵³. En el año 2006, en Estado Unidos el consumo medio se estimó en 12,5 mg/día aportado principalmente por cianidina (44,7%), seguido de delphinidina (20,7%), malvidina (15,4%), petunidina (9%), peonidina (6,9%) y pelargonidina (3,3%). En 2007, se volvió a estimar el consumo en Estados Unidos, obteniendo esta vez una ingesta de antocianos de 3 mg/día⁵⁶.

Por otro lado, en Finlandia, donde el consumo de bayas es elevado, se estimó la media en 82 mg/día, alcanzándose en algunas personas los 200 mg/día⁵⁷. Los datos más recientes han estimado el consumo medio total de antocianos en España, Francia, Irlanda y UK en 18,5, 57, 60 y 69 mg/día/persona, respectivamente^{54, 58, 59}.

Los datos indican que la ingesta de antocianos es baja en relación a su distribución en la naturaleza. Todas estas diferencias son debidas a la estacionalidad y a la variabilidad de gustos alimenticios, así las personas que consuman vino tinto y/o frutos rojos van a ver incrementada su ingesta de antocianos notablemente. Además, el consumo de suplementos o alimentos ricos en colorantes también va a incrementar su ingesta.

1.3 ANÁLISIS DE ANTOCIANOS

El análisis de antocianos es complejo debido a su capacidad de unirse a otros componentes de la muestra y de sufrir transformaciones estructurales.

1.3.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

Las extracciones se realizan generalmente partiendo de frutos desecados, liofilizados o incluso congelados, lías del vino o también por maceración del fruto fresco.

Comúnmente en la extracción de antocianos partiendo de frutos se usa metanol o etanol con una pequeña cantidad de ácido con el objetivo de mantener estable el catión flavilio⁶⁰. La extracción se basa en la maceración repetida, a bajas temperaturas y en periodos de hasta 24 horas, extracciones más prolongadas pueden ocasionar la oxidación por aire o luz. Además, el ácido puede causar una hidrólisis parcial de los restos acilo de los antocianos acilados.

Actualmente se están utilizando nuevas técnicas para la extracción de antocianos tales como el uso de microondas, fluidos supercríticos, altas presiones o la extracción mediante soxhlet^{61, 62} cuyos tiempos de extracción oscilan entre 1 minuto y 24 h.

Una vez extraídos los pigmentos, se realiza la concentración a vacío tras la adición de agua a una temperatura no demasiado elevada, en torno a 30 °C. Si el extracto contiene material lipídico se le adiciona un solvente orgánico como *n*-hexano para eliminarlo y finalmente se vuelve a concentrar a vacío.

Generalmente suele ser necesaria una purificación inicial de los extractos con el fin de eliminar impurezas (azúcares, ácidos orgánicos, etc.). Para ello, se utiliza la extracción en fase sólida con cartuchos C₁₈ o cromatografía en columna, en la que se emplean diferentes tipos de fases estacionarias como polivinilpirrolidona (PVP), poliamida, geles de dextrano (Sephadex), resinas de intercambio iónico, celulósicas, etc.

1.3.2 SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La caracterización y cuantificación de una mezcla de antocianos requiere de la separación de cada compuesto. La técnica más empleada tanto para el aislamiento como para la identificación y cuantificación es la **cromatografía líquida de alta eficacia** en fase reversa (RP-HPLC), generalmente acoplada a un sistema de detección de diodo array (DAD-“Diode Array Dector”). Para ello, se usan columnas cuya fase estacionaria es principalmente gel de sílice que lleva unidos restos C_{18} y un sistema de elución en gradiente binario usando como eluyentes solventes acuosos acidificados con ácidos acético, fórmico o perclórico, así como solventes orgánicos como metanol o acetonitrilo.

La polaridad de los antocianos es el factor más influyente en su elución en la columna y por lo tanto en los tiempos de retención. Los antocianos con mayor número de grupos hidroxilos en el anillo B son más polares y eluyen antes, mientras que los grupos metoxilos hacen a la molécula más apolar. De esta manera, el típico orden de elución de los seis principales antocianos es delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina y malvidina. Además, los sustituyentes de azúcar en la molécula aumentan la polaridad y acortan los tiempos de retención. Aunque, la polaridad también depende del tipo de azúcar y su posición. Por otro lado, la acilación de la molécula de los antocianos disminuye la polaridad.

El espectro de absorbancia en ultravioleta-visible (UV-Vis) de un antociano proporciona información referente al compuesto. Por ello idealmente, el equipo de HPLC está acoplado a un sistema de detector de fotodiodos, que genera datos espectrales en el UV-Vis, lo que permite obtener tanto el espectro de absorción como registrar cromatogramas a diferentes longitudes de onda.

El anillo aromático que poseen los antocianos les confiere la propiedad de absorber en el UV-Vis proporcionando diferentes espectros. A pH ácido, los antocianos presentan un amplio rango de absorción en la región final del azul del visible cuyo máximo de absorción se encuentra entre 500 y 535 nm y otro máximo en el ultravioleta entre 270 y 280 nm⁶³. Dicha absorción está influenciada por el número de sustituyentes, así según aumenta el número de hidroxilos en el anillo B, el máximo de absorción se desplaza batocrómicamente hacia mayores longitudes de onda (color azulado), mientras que la presencia de grupos metoxilo en el anillo B produce un desplazamiento hipsocrómico a longitudes de ondas más bajas (color rojo).

Los antocianos separados son medidos a 520 nm y la identidad del antociano se basa en comparar su correspondiente tiempo de retención y su espectro en el UV-Vis con compuestos puros estándares. Así, el contenido total del antociano es calculado en $\mu\text{g/g}$ o μM usando una curva de calibración estándar.

Existen otras técnicas como la **cromatografía en contracorriente de alta velocidad** (HSCCC-“High-Speed Counter-Current Chromatography”) y la **cromatografía de partición centrífuga de alta eficacia** (HPCPC-“High Performance Centrifugal Partition Chromatography”) que han sido utilizadas para la separación y purificación de antocianos⁶⁴. Estas técnicas son más baratas al no necesitar de fase estacionaria. Además, la recuperación de la muestra es completa porque no se produce adsorción irreversible en la superficie activa.

Por otro lado, la **electroforesis capilar** (CE-“Capillary Electroforesis”) ha sido utilizada para la separación iónica de los compuestos mediante cargas⁶⁵. CE es una técnica alternativa a la separación y cuantificación por HPLC de vinos⁶⁶.

1.3.3 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

La caracterización estructural de la molécula de antociano implica la identificación del aglicón, de los azúcares y de los distintos sustituyentes.

Las propiedades espectrales son generalmente usadas para la caracterización de antocianos, así la **espectroscopia UV-Vis** es usada frecuentemente para identificar y cuantificar antocianos. Como se ha comentado anteriormente, la cromatografía líquida de alta eficacia suele estar acoplada a un sistema de DAD lo que la hace ser la principal técnica utilizada para el análisis de antocianos.

El desarrollo de la **cromatografía líquida de ultra alta eficacia** (UPLC-“Ultra Performance Liquid Chromatography”) ha mejorado significativamente el tiempo de separación acortando el tiempo de análisis, así como aumentando su sensibilidad y resolución comparado con HPLC⁶⁷.

La **espectrometría de masas** es otra técnica muy utilizada para la identificación de antocianos a partir de la determinación de las masas de los iones moleculares en la muestra e identificación de los fragmentos producidos por ruptura de estos compuestos a través de la aplicación de elevadas energías de ionización⁶⁸. La cromatografía líquida unida a la espectrometría de masas (LC-MS-“Liquid Chromatography–Mass Spectrometry”) es usada para confirmar la identidad de los antocianos en plantas y

fluidos biológicos. Con el desarrollo de una ionización a presión atmosférica (API) acoplado a un HPLC-MS se puede tener información de los iones moleculares y del patrón de fragmentación⁶⁹.

La principal técnica de ionización para identificar bajos niveles de compuestos en matrices complejas es la de electrospray (ESI) en espectrometría de masas (ESI-MS) (**Figura 1.10**). Voltajes pequeños y a presión atmosférica dan lugar a iones intactos que permiten detectar fácilmente las cargas positivas, en el caso de los antocianos, a bajo pH en un analizador de masas (por ejemplo, tiempo de vuelo (TOF-“Time of Flight”); así los antocianos se obtienen mejor en forma positiva⁷⁰, ion M^+ . Cuando la ionización no ha producido muchos fragmentos, se realiza la disociación inducida por colisión (CID)⁷¹. Dicha disociación proporciona información estructural por ejemplo del aglicón y del glicósido⁷⁰.



Figura 1.10. Espectrómetro de masas compuesto de una interfase en modo de ionización, un analizador que separa las moléculas en base a su relación m/z y un detector.

Otra técnica es la **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)** usada principalmente para elucidar las estructuras de los antocianos como por ejemplo antocianos acilados y/o poliglicosilados.

La **fluorimetría** se usa alguna vez para la identificación de compuestos en muestras como el vino. Los 3,5-diglicósidos de antocianidinas forman derivados fluorescentes después de su oxidación y posterior ajuste del pH a valores alcalinos.

1.4 BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE ANTOCIANOS

No sólo es importante conocer la cantidad de antocianos que se ingiere en la dieta, sino también conocer su biodisponibilidad en el cuerpo humano. La definición comúnmente aceptada de biodisponibilidad hace referencia a la proporción de nutriente que es digerida, absorbida y metabolizada mediante una vía normal para que pueda llegar a los tejidos⁷².

La absorción de los antocianos, principalmente en su forma intacta como glucósidos⁷³⁻⁷⁵, tiene lugar a través del estómago y del intestino, por procesos que deben implicar a las bilitranslocasas y/o a mecanismos de transporte saturables⁷⁶⁻⁷⁸. El transporte pasivo a través del enterocito está limitado en los antocianos por ser moléculas altamente hidrosolubles. Por lo tanto, es probable que los glicósidos requieran de un transporte activo⁷⁹⁻⁸¹. Dicha absorción está influenciada por el tipo de aglicón y por el residuo de azúcar. Por otro lado, parece que los ramnósidos necesitan ser metabolizados en el colon para ser absorbidos⁷⁹.

La mayoría de los estudios en humanos han establecido que los antocianos son absorbidos rápidamente, alcanzándose concentraciones máximas en plasma (C_{max}) entre 1,4 y 592 nmol/L después de ingerir dosis de antocianos entre 56 y 1300 mg, en un rango entre 20 min y 4 h. La excreción media de antocianos en orina, respecto al total ingerido, está entre 0,003 y 0,1% (**Tabla 1.3**), exceptuando algún estudio donde la excreción de antocianos llega a alcanzar hasta el 5% de la dosis ingerida tras el consumo de 651, 218 y 77 mg de antocianos contenidos en zumo de arándano, vino tinto y fresas, respectivamente⁸²⁻⁸⁴. La máxima excreción en orina tiene lugar en un rango entre 1 y 4 h cuya semivida de eliminación plasmática ($t_{1/2}$) está entre 1,5 y 3 h⁸⁵.

Bub *et al.*⁸⁶ observaron que la malvidina-3-glucósido alcanza una C_{max} de 1,4 nM a las 0,8 h tras la ingesta de 500 mL de vino tinto cuyo contenido en malvidina-3-glucósido es de 68 mg, así como una excreción menor al 0,03% de la cantidad ingerida. Otro estudio más reciente demostró que 90 mg de malvidina-3-glucósido presenta una C_{max} en plasma de 4,2 nM en su forma intacta a un tiempo de 1,8 h y con una $t_{1/2}$ de 2 h.

Tabla 1.3. Estudios de biodisponibilidad de antocianos en humanos.

Fuente	Dosis ingerida	C _{max} ^a	t _{max} ^b (h)	% orina excretada ^c	Referencia
Vino tinto (300 mL)	218 mg			5,10	82
Extracto de baya de sauco	1,5 g	100 ng/mL	0,5		87
Grosella negra	236 mg	0,120 µmol/L	1,25-1,75	0,11	74
Zumo baya de sauco	180 mg	35 ng/mL	1		88
Zumo de mora (200 mL)	153 mg			0,02-0,05	89
Vino tinto (500 mL)	68 mg Mv3G ^d	0,0014 µmol/L	0,8	0,02	
Vino tinto desalcoholizado	56 mg Mv3G ^d	0,0017 µmol/L	1,5	0,02	86
Zumo de uva tinta (500mL)	117mg Mv3G ^d	0,0028 µmol/L	2,0	0,02	
Bayas de sauco (11 g)	1,9 g			0,003-0,012	90
Arándano en polvo (100 g)	1,2 g	0,029 µmol/L	4		91
Baya de sauco (12 g)	720 mg	0,097 µmol/L	1,2	0,06	92
Baya de sauco (12 g)	720 mg			0,08	93
Arándano (189 g)	690 mg		1,5	0,004	93
Vino tinto (400 mL)	180 mg	43 ng/mL	0,5	0,23	94
Zumo uva tinta (400 mL)	284 mg	100 ng/mL	0,75	0,18	94
	1,24 g	53 ng/mL	0,75	0,07	
Zumo de mora	0,72 g	16 ng/mL	1,5	0,05	95
	0,75 g	32 ng/mL		0,05	
Concentrado de mora (300 mL)	189 mg			0,06	96
Concentrado mora roja (300 mL)	345 mg			0,03	96
Extracto de arándano (300 mL)	439 mg			0,02	96
Fresas (200 g)	76 mg			1,8	83
Extracto de aronia	721 mg	96 nmol/L	2,8	0,15	97
Mora (200 g)	431 mg			0,16	98
Aronia	1300 mg	592 nmol/L		0,048	97
Extracto de uva tinta (12 g)	90 mg Mv3G ^d	4,2 nmol/L	1,8	0,06	99

^a Concentración máxima alcanzada en plasma.

^b Tiempo en alcanzar la C_{max}.

^c % de lo ingerido.

^d Malvidina-3-glucósido.

Todos estos estudios demuestran que tanto la absorción como la eliminación ocurren rápidamente.

Durante la absorción, los polifenoles sufren reacciones de conjugación en las células intestinales y luego en las hepáticas y renales (metilación, sulfatación y glucuronización) (**Figura 1.11**). Así en general, los compuestos que llegan a la sangre y a los tejidos son estos compuestos conjugados y las formas intactas. Parte de estos compuestos pueden volver al intestino delgado vía enterohepática o ser eliminados por la orina.

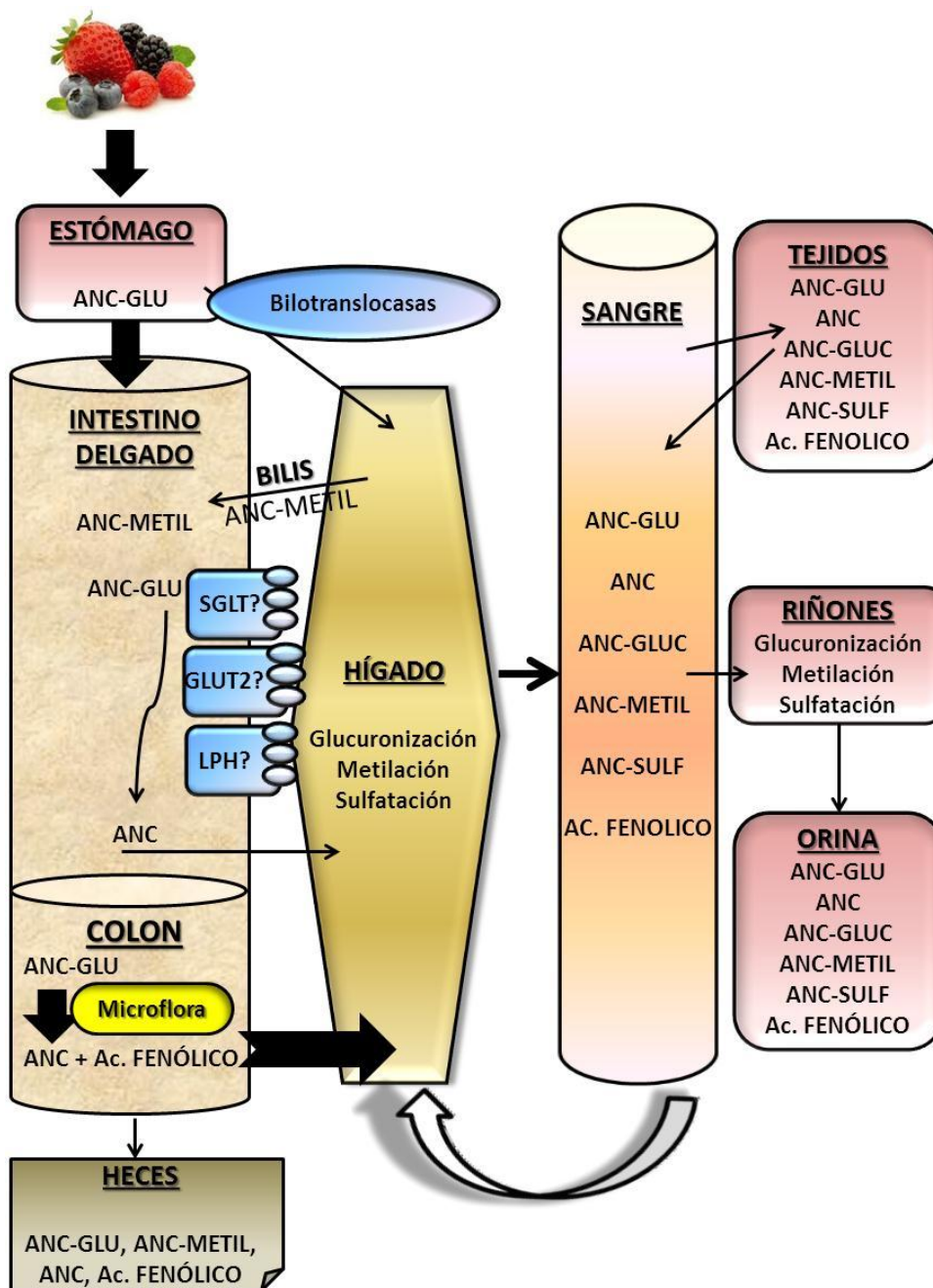


Figura 1.11. Ruta esquemática de la absorción, metabolismo y eliminación de antocianos en humanos (adaptado de McGhie y Walton, 2007¹⁰⁰). ANC-GLU=antociano glicosilado; ANC=antocianidina; ANC-GLUC=antociano glucuronidado; ANC-METIL=antociano metilado; ANC-SULF=antociano sulfatado; SGLT1=transportador de glucosa sodio dependiente, GLUT2=transportador de glucosa; LPH=lactasa-floridina hidrolasa.

Todas las evidencias indican una baja absorción de los antocianos, en torno al 5% en el duodeno¹⁰¹, así como un nivel bajo de excreción, lo que ha llevado a pensar en la aparente baja biodisponibilidad de los antocianos. Sin embargo, algunos estudios revelan que la biodisponibilidad ha sido subestimada¹⁰² ya que el aumento de pH en el intestino convierte a los antocianos en sus formas calconas, bases quinoidales y

hemiacetales que no han sido tenidos en cuenta debido a la ausencia de un buen método analítico¹⁰⁰. Además, han aparecido nuevos metabolitos de antocianos que no deben ser ignorados, por ejemplo, Tsuda *et al.*¹⁰³ observaron que tras el consumo de un extracto rico en cianidina-3-glucósido la concentración de ácido protocatéquico en sangre es 8 veces más alta que la del propio antociano.

Por consiguiente, han sido realizados estudios más recientes donde se aprecia que el resto de antocianos no absorbidos en el duodeno pasan al intestino grueso sin sufrir transformaciones previas, en el cual son sometidos a la acción de la flora intestinal. Kahle *et al.*¹⁰⁴ observaron en voluntarios ileostomizados sanos que habían ingerido moras, ricas en antocianos, que a pesar del impacto del pH sobre la estabilidad de los antocianos, hay grandes cantidades, hasta el 85% (dependiendo del residuo de azúcar) de los antocianos ingeridos que alcanzan el colon. Otros autores, indican que a las 4 h después del consumo de frambuesas y/o moras, las cantidades de antocianos que pueden llegar al colon están entre un 40 y 46% de lo ingerido^{105, 106}. De hecho, estudios *in vitro* han demostrado que los monoglucósidos (cianidina-3-glucósido, malvidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido) y diglucósidos (cianidina-3,5-diglucósido, malvidina-3,5-diglucósido y rutinósido de cianidina) son desglucosilados por la acción de la microflora colónica en un periodo de tiempo entre 20 min y 2 h, dependiendo de la molécula de azúcar y de la estructura^{107, 108}. Debido a la alta inestabilidad de los correspondientes aglicones formados, a los 20 min de la incubación de los antocianos con la flora intestinal aparecen los primeros productos de degradación, éstos son los ácidos fenólicos correspondientes al anillo B y el 2,4,6-trihidroxibenzaldehído (aldehído de floroglucinol) correspondiente al anillo A (**Figura 1.12**). Así, los productos primarios de degradación de cianidina, malvidina y peonidina son los ácidos protocatéquico, siríntrico y vanílico, respectivamente. A continuación, los ácidos siríntrico y vanílico pueden ser desmetilados por la flora intestinal para formar el ácido gálico y el protocatéquico, respectivamente. A su vez, el ácido gálico puede continuar su degradación a pirogalol o catecol¹⁰⁹. Por otro lado, el aldehído de floroglucinol es muy inestable y sigue su degradación posiblemente por reacción con grupos NH₂ de aminoácidos. Además, puede oxidarse a ácido floroglucinol¹⁰⁸. De acuerdo con estos estudios, Vitaglione *et al.*¹¹⁰ detectaron el ácido protocatéquico como metabolito de la cianidina-3-glucósido después de 6 h de su consumo. En otro estudio *in vitro*, se identificaron los ácidos vanílico y protocatéquico como los productos de degradación mayoritarios de la peonidina-3-glucósido y la cianidina-3-glucósido, respectivamente,

después de su incubación con heces humanas¹¹¹. Wu *et al.*¹¹² también detectaron como fenol mayoritario el ácido protocatéquico seguido por los ácidos 4-hidroxicinámico, cafeico, ferúlico y 3-hidroxibenzoico al analizar el perfil de compuestos en el tracto gastrointestinal de cerdos después de la ingestión de frambuesas. Por otro lado, después del consumo de fresas (750 g), los principales compuestos fenólicos encontrados en la orina después de 5 h fueron los ácidos 4-hidroxibenzoico, protocatéquico, vanílico y gentísico¹¹³.

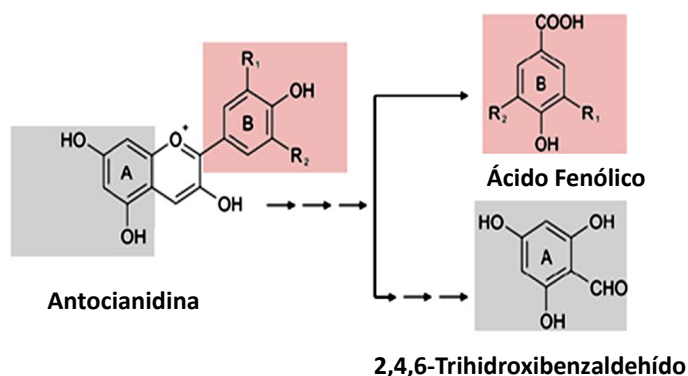


Figura 1.12. Degradación de antocianos.

Otros compuestos fenólicos como el ácido 3-O-metil gálico, siríngico o 2,4,6-trihidroxibenzaldehído han sido descritos tras la incubación del contenido colónico de cerdos con un extracto de uva Cabernet Sauvignon la cual contiene delfinidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido¹¹⁴. Así mismo, el consumo de puré de arándanos que contenía glucósidos de delfinidina, malvidina, peonidina, petunidina y cianidia resultó en la excreción urinaria a las 4-6 h de ácidos homovanílico, vanílico y bajas cantidades de ácido siríngico, pero no de ácido gálico esperado a partir de delfinidina, por lo que, aunque parte de los antocianos son fragmentados a ácidos fenólicos, hay más metabolitos por identificar¹¹⁵. Por otro lado, la suplementación durante 4 días con 200 g/día de frambuesas no produjo cambios en la composición fenólica del líquido colónico, aunque sí incrementó el ácido protocatéquico, el cual es representativo del metabolismo de la cianidina¹¹⁶.

No obstante, después de la liberación del aglicón al medio, no sólo la microflora intestinal es responsable del metabolismo de antocianidinas, sino que pueden ser degradadas químicamente para dar lugar a ácidos fenólicos y aldehídos^{117, 118}.

Una vez formados estos metabolitos por la microflora intestinal pueden ser absorbidos y conjugados¹¹⁸, con lo cual la eficiencia en la absorción del aglicón

disminuye. Además, estos compuestos son más polares y por lo tanto pueden ser eliminados por la orina o pueden volver al duodeno por la vía enterohepática. Aunque, antes de ser eliminados por orina, los antocianos y sus metabolitos circulantes en plasma se unen a la albúmina y son capaces de incorporarse a tejidos como estómago, intestino, hígado, riñones, pulmón, cerebro y tejido ocular^{119, 120}.

Algunos autores consideran que los numerosos efectos beneficiosos atribuidos al consumo de antocianos pueden ser debidos en parte a la bioactividad de estos metabolitos fenólicos, ya que la mayoría de los compuestos encontrados en plasma u orina son estos derivados de los antocianos^{110, 114, 121}.

1.4.1 PAPEL DE LA FLORA COLÓNICA EN EL METABOLISMO

El tracto gastrointestinal alberga entre 10 y 100 trillones de microorganismos¹²², aunque la gran mayoría se localizan en el colon, donde se alcanzan concentraciones en torno a 10^{11} - 10^{12} unidades formadoras de colonias/g de unas 500 especies bacterianas distintas; sin embargo, sólo unas pocas especies han sido identificadas como catalizadoras del metabolismo de fenoles^{18, 123-126}. Aproximadamente el 30% de los organismos presentes pertenecen a tres géneros: *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. y *Eubacterium* spp., pero también hay un importante número de *Bifidobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., y *Fusobacterium* spp., entre otros, que predominan en el colon¹²⁷.

La colonización del tracto gastrointestinal tiene lugar en los neonatos inmediatamente después de nacer. El patrón de colonización bacteriano está influenciado por el tipo de dieta y el medio ambiente. Así, el perfil de la microbiota en la población asiática es diferente a la occidental. Sin embargo, algunas evidencias demuestran que cambios en la dieta de ratas producen cambios apreciables en el catabolismo de polifenoles¹²⁸.

El tracto gastrointestinal es visto como un recipiente anaeróbico donde tiene lugar la fermentación de compuestos que no son absorbidos en el intestino delgado como polisacáridos, lípidos, polifenoles y xenobióticos. Varios estudios han tratado de investigar estas transformaciones mediante modelos *in vitro* usando cepas bacterianas, fluido ileostómico o con microbiota humana/animal donde se monitoriza la desaparición del sustrato o la aparición de nuevos catabolitos o las modificaciones en la microbiota, pero raramente se estudian los tres parámetros a la vez¹²¹.

Las principales transformaciones llevadas a cabo en polifenoles por la microbiota incluyen O- y C-desglicosilación, la hidrólisis de ésteres y amidas, así como la desglucuronización. Además, los aglicones son susceptibles de sufrir hidroxilación, y desmetilación aromática; hidrogenación y α y β -oxidación de las estructuras alifáticas generadas tras la ruptura del anillo aromático¹²⁹⁻¹³². La mayoría de las investigaciones se han centrado en el catabolismo fenólico, por ejemplo, los que retienen al menos un hidroxilo fenólico, pero la completa deshidroxilación también puede ocurrir produciendo catabolitos aromáticos^{128, 133}. Un paso clave en el catabolismo de flavonoides podría ser la fisión del anillo A y la pérdida de carbonos C5 a C8 que por último serían metabolizados a CO₂.

Algunos autores han sugerido como posibles vías de metabolismo la deshidroxilación y reducción de dobles enlaces carbono-carbono por *Lactobacillus casei*, así como alargamientos y acortamientos de la cadena alifática C por *Salmonella enteridis* y *Escherichia coli*, respectivamente¹³⁴. *Eubacterium* spp. es reconocido por su habilidad para romper al anillo C, su actividad desglicosilasa, calcona isomerasa y floretina hidrolasa^{123, 125, 135, 136}. *Eubacterium limosum* desmetila isoflavonas¹³⁷ y algunas especies de *Clostridium* spp. pueden escindir el anillo C de los flavonoides¹³⁸. Algunas *Fusobacterium* spp. y *Bacteroides* spp. poseen actividad α -L-ramnosidasa¹³⁹, β -D-glucosidasa¹⁴⁰, β -D-galactosidasa¹³⁹ y β -D-glucuronidasa¹⁴¹.

En general, experimentos *in vitro* han demostrado que varios flavonoides son metabolizados por las bacterias intestinales rompiendo el anillo C y dando lugar a ácidos fenólicos y compuestos aromáticos^{142, 143}. Además, estos metabolitos liberados por algunas bacterias pueden ser el sustrato de otras y por lo tanto en el medio colónico se pueden encontrar multitud de metabolitos ampliamente biotransformados, cuya diversidad depende en gran medida de la microbiota del hospedador.

1.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ANTOCIANOS

Los principales efectos beneficiosos sobre la salud humana de los antocianos son atribuidos en su mayoría a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y más recientemente a su papel regulador en vías de señalización celular y de expresión génica^{144, 145}. A pesar de la baja biodisponibilidad de los antocianos, pueden ejercer efectos beneficiosos:

Actividad anticancerígena: estudios *in vitro* sugieren que la actividad anticancerígena de los antocianos se debe a sus propiedades antiproliferativas, prooxidantes y apoptóticas, así como a su capacidad de regular la expresión génica¹¹⁷. Se ha demostrado, por ejemplo, inhibición de la proliferación celular con extracto de frambuesas y vino en células hepáticas (HepG-2) y en adenocarcinoma humano (HT-29)^{146, 147}. Además, el extracto de frambuesa es capaz de inhibir la iniciación de la angiogénesis evitando la proliferación en el endotelio¹⁴⁸.

Diabetes y obesidad: el consumo de extracto de fresa en adultos con sobrepeso se asocia con una reducción inflamatoria postprandial del tejido adiposo, así como con una mayor sensibilidad de la insulina¹⁴⁹. La prevención de la obesidad, así como una disminución de hiperlipidemia e hiperglucemia se relaciona con el consumo de antocianos en ratas¹⁵⁰. Es bien conocido que los antocianos protegen del estrés oxidativo inducido por glucosa en las células β del páncreas, Jayaprakasam *et al.*¹⁵¹ observaron que los glucósidos de cianidina, delfinidina y pelargonidina mejoran la secreción de insulina en ratones indicando que los hidroxilos en el anillo B tienen efecto secretagogo.

Actividad ocular: algunos estudios han encontrado altas concentraciones de antocianos (700 pg/g) en el tejido ocular¹⁵² mostrando actividad antioxidante en la retina. Las investigaciones llevadas a cabo en animales alimentados con extractos de arándano o mora han demostrado la disminución de cataratas, así como una mejora en la adaptación nocturna, disminución moderada de miopía, reducción de fatiga ocular y mejora en la presión sanguínea de la retina en ojos con glaucoma^{153, 154}.

Actividad neuronal: los antocianos pueden atravesar la barrera encefálica y distribuirse en el sistema nervioso donde merman el daño oxidativo implicado en enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer¹⁵⁵. Al mismo tiempo, el consumo de bayas mejora la función cerebral por su implicación en la inhibición neuroinflamatoria y en la modulación de señales neuronales cuyo resultado es la mejora cognitiva y de memoria¹⁵⁶.

Actividad antimicrobiana y antiviral: estudios realizados en patógenos con extractos de arándanos han mostrado efecto antimicrobiano en algunas de las bacterias más ubicuas en alimentos como *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*^{157, 158}. Otros autores han observado que *Helicobacter pilory* y *Bacillus cereus* son las bacterias más sensibles al efecto de las bayas¹⁵⁹. Respecto a las propiedades antivirales, la cianidina glicosilada presenta actividad frente a influenza A y B, así como al virus del herpes¹⁶⁰.

1.5.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANOS

1.5.1.1 ESTRÉS OXIDATIVO

Como consecuencia del metabolismo celular, un pequeño porcentaje (<5%) del oxígeno consumido por el hombre es convertido en especies reactivas de oxígeno (EROS) y también en especies reactivas de nitrógeno (ENOS). Ambas, también se pueden formar durante procesos endógenos y por las acciones enzimáticas, por ejemplo, de la NADPH oxidasa durante los procesos inflamatorios y fagocitarios, la ciclooxigenasa (COX) en la cascada del ácido araquidónico, la xantina oxidasa (XO) en el metabolismo del ácido úrico, las óxido nítrico sintasas (NOS) y la monoamino oxidasa (MAO). No obstante, EROS y ENOS pueden ser producidas en las células musculares lisas en respuesta a la angiotensina II (Ang II), hormona que tiene la capacidad de estimular la actividad de la NADPH oxidasa, la cual genera O_2^- en células vasculares. Además, algunas especies reactivas son formadas por factores externos (ambientales, dietéticos, etc.)¹⁶¹.

Las EROS y ENOS incluyen tanto a radicales libres como el radical peroxilo (ROO^\bullet), hidroxilo (OH^\bullet), el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el óxido nítrico (NO^\bullet) y el dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), así como moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2), el peroxinitrito ($ONOO^-$) o el anión nitroxilo (NO^-), entre otros, que son moléculas altamente reactivas y fácilmente convertibles en radicales. Un radical libre es cualquier especie química que posee uno o más electrones desapareados en sus orbitales y que son altamente reactivos¹⁶¹.

El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio a corto o largo plazo entre antioxidantes/prooxidantes que provoca la disrupción de los sistemas de señalización y control a consecuencia de favorecer los procesos de pro-oxidación. Las EROS y ENOS son capaces de oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que resulta en un cambio de sus estructuras y funciones.

Estudios clínicos establecen una asociación entre el estrés oxidativo y las ECVs, siendo este estado un evento precoz del desarrollo de la disfunción endotelial y de la subsecuente ECV^{162, 163}. Así mismo, el estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular como diabetes, Alzheimer, Parkinson, enfermedades neurológicas, cáncer, artritis, infarto de miocardio, entre otras¹⁶⁴⁻¹⁶⁷.

1.5.1.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Sustancia antioxidante es aquella que encontrándose en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retarda o inhibe la oxidación del mismo¹⁶⁸.

El cuerpo humano dispone tanto de un sistema antioxidante endógeno como exógeno. Su primera línea de defensa incluye a enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión-peroxidasa, la glutatión-transferasa y la catalasa, entre otras. En ocasiones, las defensas antioxidantes endógenas no son efectivas y necesitan antioxidantes exógenos como la vitamina C, la vitamina E, los carotenos y polifenoles que son principalmente compuestos donadores de hidrógenos, quelantes de metales implicados en la oxidación y captadores de radicales libres. En general, la capacidad antioxidante de un compuesto está relacionada con las siguientes funciones:

- a) Captación de radicales libres del medio evitando el proceso oxidativo, en el caso de los fenoles se formaría el radical flavílico menos reactivo y estable por deslocalización del electrón en su estructura.
- b) Evitar la formación de radicales libres, por ejemplo quelando iones de transición y evitando la formación de radicales libres de la reacción de Fenton. Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilo cercanos en el anillo aromático.
- c) Modulación de la actividad de enzimas antioxidantes.

Además, dichas funciones se ven afectadas por la interacción entre antioxidantes, así el ácido ascórbico o la epicatequina aumentan el potencial captador de radicales del tocoferol¹⁶⁹, mientras que los diversos polifenoles de la dieta pueden interaccionar entre sí en ambos sentidos^{170, 171}. Por lo tanto, el sistema exógeno es un eslabón clave en la prevención del daño oxidativo y de sus consecuencias.

1.5.1.3 MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de los compuestos puede ser evaluada tanto en alimentos como en sistemas biológicos. Los ensayos antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos: los que evalúan la oxidación de moléculas diana como lípidos, proteínas, hidratos de carbono y DNA, así como los basados en la medida de la captación de radicales libres. Dentro de éstos, los ensayos se basan en transferencia de hidrógenos o de electrones¹⁷².

I. Métodos para evaluar la oxidación de moléculas diana

Los principales métodos están basados en la medida de los productos que la oxidación produce sobre lípidos como moléculas diana. Un gran número de fenómenos químicos y físicos pueden iniciar la oxidación de los lípidos y continuar con las distintas etapas de la oxidación (**Figura 1.13**) dando lugar a diversos compuestos que son fácilmente medibles y usados para cuantificar la capacidad antioxidante de un sustrato. Así pueden usarse los siguientes métodos¹⁷³: medida del consumo de oxígeno, medida de la formación de dienos conjugados, medida de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDLs), medida de los productos de descomposición de peróxidos, tales como el malondialdehído, entre otros. Por otro lado, también hay que considerar los métodos basados en la medida de los productos finales que la oxidación produce sobre proteínas (medida del contenido de carbonilos totales) y DNA (medida de la formación de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina).

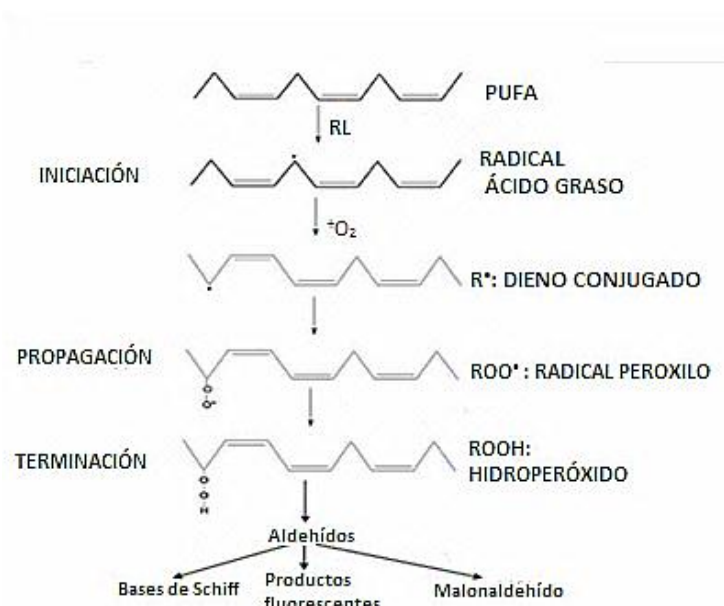


Figura 1.13. Etapas de la oxidación lipídica.

II. Métodos para evaluar la captación de radicales libres

La correcta evaluación de la actividad antioxidante requiere del uso de varias técnicas analíticas distintas a fin de elucidar los diferentes mecanismos de acción de los antioxidantes. Así, las propiedades antioxidantes mediante la medida de la captación de radicales libres de los compuestos y la evaluación de sus propiedades reductoras pueden evaluarse *in vitro* principalmente por varios métodos^{161, 173-175}:

- a) Secuestro de radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$): usando como fuente enzimática la *xantina oxidasa* o por *Fotoquimioluminiscencia (FLC)/Photochem*: método que mide la capacidad de los antioxidantes de unirse al radical superóxido tanto en medio liposoluble como hidrosoluble. La excitación mediante irradiación de la sustancia fotosintetizadora (luminol) produce radicales superóxido que al ser atrapados por el antioxidante disminuyen la luminiscencia. Se usa en matrices alimentarias y en plasma por ser rápido, sensible y eficaz.
- b) Secuestro de peróxido de hidrógeno (H_2O_2): uno de los métodos más comunes para evaluar el secuestro de este radical es mediante peroxidasas de rábano las cuales utilizan H_2O_2 para oxidar escopoletina en un producto no fluorescente. También hay otros métodos no enzimáticos basados en la quimioluminiscencia del luminol en presencia de hipoclorito o por medición a 410 nm del complejo que se forma al reaccionar directamente el H_2O_2 con titanio IV.
- c) Secuestro de radicales hidroxilo (OH^{\bullet}): evaluado mediante el *test de la desoxirribosa* en el cual el OH^{\bullet} formado por reacción entre $Fe^{+3}/EDTA/H_2O_2$, en presencia de ascorbato, ataca al azúcar y origina productos reactivos con el tiobarbitúrico originando un compuesto rosa que es cuantificado por espectrometría.
- d) Secuestro del radical peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$): la principal técnica se basa en medir por fluorimetría la inhibición de la oxidación de dihidro-rodamina 123 por $ONOO^{\bullet}$ a rodamina fluorescente.
- e) Secuestro del radical peroxilo (ROO^{\bullet}): miden la capacidad de captar radicales peroxilo generados a través de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) diclorhidrato (AAPH) mediante transferencia de hidrógenos:
- *Potencial de captación total de radicales (TRAP-“Total Radical-trapping Antioxidant Parameter”)*: se desarrolló para medir el estado antioxidante en plasma humano. La oxidación se mide mediante el consumo de oxígeno medido por electrodos o por la disminución de fluorescencia de β -ficoeritrina por fluorimetría.
 - *Capacidad de captación de radicales oxigenados (ORAC-“Oxygen Radical Absorbance Capacity”)*: mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente como la fluoresceína. Se cuantifica como área neta bajo la curva. Es uno de los métodos más relevantes para sistemas biológicos.

- *Capacidad secuestradora de radicales de oxígeno totales (TOSC-“Total Oxyradical Scavenging Capacity”)*: se basa en la inhibición de la oxidación del ácido α -ceto- γ -metiltiobutírico producida por radicales y puede medirse por cromatografía de gases. Se usa en compuestos puros y tejidos.

- f) *Secuestro del radical catión ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) o Capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC-“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”)*: mide la capacidad de reducir directamente el radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ por transferencia de electrones evaluando la disminución de la absorbancia a 734 nm. Es un método reproducible y de bajo coste.

- g) *Secuestro del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)*: se basa en la reducción del radical por transferencia de electrones y se cuantifica midiendo la absorbancia a 515 nm o por espectrometría de resonancia de espín electrónico (ESR-“Electron Spin Resonance”). Se emplea para evaluar la eficacia antiradicalaria, ya que es un radical estable que ofrece alta intensidad y que proporciona resultados reproducibles.

- h) *Secuestro del radical catión N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)*: mide la capacidad de reducir el radical catión $DMPD^{\bullet+}$ por transferencia de electrones causando una disminución de la absorbancia a 505 nm. Se usa principalmente en alimentos.

- i) *Espectroscopía de resonancia de espín electrónico (ESR)*: es la única técnica que puede detectar específicamente los radicales libres, sin embargo por su corta vida los radicales libres se asocian con otros compuestos como el N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina (DMPO) para formar aductos que pueden ser detectados por espectrometría.

III. Otros métodos basados en el poder reductor:

- a) *Capacidad de reducción férrica (FRAP-“Ferric Reducing Antioxidant Power”)*: mide la capacidad de reducción, por transferencia de electrones del paso del complejo incoloro $TPTZ-Fe^{3+}$ al complejo azulado $TPTZ-Fe^{2+}$ que absorbe a 593 nm. Puede ser expresado como $\mu\text{mol } Fe^{2+}$ o como equivalentes de un estándar. Es un método rápido y reproducible para medir la actividad en fluidos biológicos y alimentos.

- b) *Ensayo Folin-Ciocalteu de capacidad reductora*: se basa en transferir electrones del antioxidante al molibdeno del reactivo, formándose un complejo azulado que absorbe a 750 nm. Ofrece una estimación del valor antioxidante total.

1.5.1.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANOS Y OTROS FENOLES

Los antocianos y en general los compuestos fenólicos son considerados potentes antioxidantes *in vitro*¹⁷⁶⁻¹⁷⁹, incluso demuestran mayor capacidad antioxidante que la vitamina E o C¹⁶⁵, por ejemplo, la cianidina-3-glucósido presenta 3,5 veces más capacidad de quelar radicales de oxígeno que la vitamina E¹⁸⁰. Su capacidad antioxidante recae en su habilidad de donar un hidrógeno o un electrón, de quelar metales, así como de inducir la actividad de enzimas antioxidantes. Los criterios químicos para establecer su capacidad antioxidante son¹⁸¹:

- Presencia de un grupo catecol (dihidroxilo en las posiciones 3' y 4') del anillo B, que confiere estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de electrones. Esta estructura les confiere la propiedad de quelar metales.
- Presencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 7 del anillo A.
- Doble enlace en posición 2,3 conjugado con el grupo 4-oxo y 3-hidroxi del anillo C, responsable de la deslocalización de electrones desde el anillo B.

De acuerdo con estos criterios, la quercetina sería el flavonoide con mayores propiedades antioxidantes (**Figura 1.14**). De hecho, su capacidad antioxidante ha sido ya puesta de manifiesto¹⁸².

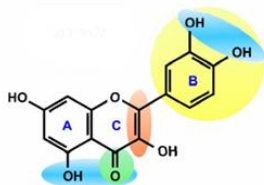


Figura 1.14. Principales grupos implicados en el potencial antioxidante. Amarillo: grupo catecol, azul: grupo hidroxilo con capacidad quelante de metales, rojo: enlace insaturado en anillo C, verde: función 4-oxo en anillo C.

La capacidad antioxidante de antocianos está ampliamente demostrada usando una variedad de métodos como el ORAC¹⁸³, FRAP, TEAC y DPPH¹⁸⁴, captación de ONOO⁻¹⁸⁵, inhibición de peroxidación lipídica¹⁸⁶ y capacidad para inducir la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión transferasa, reductasa y peroxidasa¹⁸⁷.

Generalmente su actividad antioxidante se asocia al número de hidroxilos, así la delfinidina sería la más antioxidante¹⁸⁸. Además, el grado y posición de metoxilación en el anillo B influiría negativamente en su capacidad antioxidante siendo la malvidina y la petunidina las que presentan menos actividad antioxidante.

No obstante, estas actividades dependen del radical libre presente en el medio. Por ejemplo, Muselík *et al.*¹⁸⁵ comprobaron en ensayos de FRAP y TEAC que la metoxilación reducía la capacidad antioxidante, mientras que en presencia de ONOO⁻ dicha capacidad no se veía disminuida. Tsuda *et al.*¹⁷⁷ propusieron como posible mecanismo la ruptura de la pelargonidina por ONOO⁻ con la formación de ácido *p*-hidroxibenzoico seguido de una segunda reacción con ONOO⁻ dando ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzoico que es menos reactivo.

Por otro lado, la glicosilación disminuye su capacidad antioxidante de forma general, sin embargo Kähkönen *et al.*¹⁸⁹ consideraron que depende del aglicón y del medio donde ocurra la oxidación. El número de azúcares en el carbono C3 también parece ser un factor negativo en el poder antioxidante. Otro elemento influyente serían los grupos acilo dependiendo del radical oxidante¹⁹⁰.

De hecho, el consumo de antocianos está asociado a un aumento de ácidos fenólicos en plasma y orina contribuyendo así a la actividad antioxidante de éstos ya que la mayoría presentan grupos hidroxilo en su estructura^{191, 192}.

La contribución individual de cada antociano a la actividad antioxidante total de un alimento ha sido extensamente documentada¹⁹³, sin embargo, normalmente los antocianos están presentes en alimentos interactuando con otros fenoles y examinar la actividad antioxidante aisladamente no refleja su verdadera acción¹⁹⁴. Por lo tanto, es interesante evaluar la actividad antioxidante producida como consecuencia de su interacción.

Estudios previos han puesto de manifiesto la existencia de interacciones entre flavonoides. Meyer *et al.*¹⁹⁵ mostraron una disminución de la oxidación de LDL mediante la interacción de catequina, cianidina, ácido cafeico, quercetina y ácido elágico. Así mismo, ha sido demostrado un efecto sinérgico antioxidante entre malvidina-3-glucósido o peonidina-3-glucósido y catequina inhibiendo la peroxidación lipídica, probablemente por reciclado de antocianos-radicales¹⁹⁶. Por otro lado, otros estudios realizados en arándanos, usando DPPH, han mostrado un mayor efecto antirradical en sus fracciones aisladas, especialmente la de antocianos, que en el fruto total¹⁹⁷.

1.5.2 CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE ANTOCIANOS

1.5.2.1 INFLAMACIÓN

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa para el organismo. Se trata de una respuesta inespecífica frente a diversas agresiones (infección, estrés oxidativo, traumatismos, etc.)¹⁹⁸. Dicha respuesta está generada por los agentes inflamatorios, entre los que se encuentran barreras epiteliales, células (macrófagos) y proteínas circulantes (citoquinas, mediadores de inflamación, etc.) que reconocen al agente agresor e inician respuestas que dan lugar a la inflamación.

Citoquinas: son proteínas sintetizadas en respuesta a estímulos inflamatorios que actúan modulando algunas funciones inflamatorias o de quimiotaxis, entre otras. Fundamentalmente son producidas por los linfocitos y los macrófagos activados. Las principales son el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleuquina-1 (IL-1).

Quimioquinas: son citoquinas responsables de la quimiotaxis, por ejemplo, de monocitos como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) bajo la estimulación de lipopolisacáridos (LPS) o TNF- α .

Óxido Nítrico (NO): es un compuesto volátil generado a partir de L-arginina mediante la acción de la enzima nitrato sintasa (NOs). Existen tres isoformas diferentes de esta enzima, la NOs endotelial (eNO), la NOs neuronal (nNO) y la NOs inducible (iNO). En condiciones fisiológicas normales, la eNO ejerce un importante papel en el control del tono vascular y la nNO actúa como neurotransmisor en tejido neuronal, ambas son isoformas constitutivas dependientes de calcio que producen óxido nítrico a bajas concentraciones. Sin embargo, la iNOs puede ser inducida en macrófagos y endotelio por estímulos proinflamatorios o por citoquinas como el interferón gamma (IFN- γ) y el TNF- α ocasionando la sobreproducción de óxido nítrico y sus metabolitos, como el ONOO \cdot . Éstos son compuestos muy tóxicos y pueden actuar como radicales libres, capaces de lesionar y destruir células y tejidos.

Moléculas de adhesión celular (CAMs): facilitan la adhesión de leucocitos y monocitos al endotelio cuando son inducidas por citoquinas. Entre ellas se encuentran la molécula de adhesión vascular-celular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1).

Angiotensina II (Ang II): péptido del sistema renina-angiotensina formado por la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) a partir de la angiotensina I (Ang I). Presenta funciones de citoquina por su intervención en el reclutamiento y regulación de

moléculas de adhesión, quimioquinas y del factor de crecimiento^{199, 200}. Además, es un compuesto vasoconstrictor que estimula la secreción de aldosterona, hormona que induce la retención de sodio y agua, aumentando la presión arterial. La ECA puede actuar simultáneamente en el sistema quinina-caliceína, degradando a la bradiquina que es vasodilatador.

1.5.2.2 ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN EL ORIGEN DE LA ATEROSCLEROSIS

El endotelio es el órgano que regula el tono vascular mediante la liberación de sustancias vasoactivas como el óxido nítrico. El daño generado por el estrés oxidativo propicia una disfunción endotelial y activa diversas rutas proinflamatorias que son los mecanismos clave en la aterosclerosis^{201, 202}. Así, las células endoteliales pierden su capacidad reguladora.

En condiciones de estrés oxidativo, las LDLs son susceptibles de sufrir modificaciones oxidativas en la íntima dando lugar a LDL oxidadas (LDLox) que estimulan procesos inflamatorios en el endotelio dando lugar a la expresión de citoquinas (IL-1 y TNF- α), quimioquinas (MCP-1) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) que permiten la migración de monocitos al sitio de lesión y la transformación de éstos a macrófagos. Éstos fagocitan las LDLox y se transforman en células espumosas cuya acumulación en la íntima origina la formación de estrías grasas²⁰³. Además, los macrófagos activados tienen la capacidad de secretar moléculas activas como el NO y el TNF- α favoreciendo aún más el proceso aterosclerótico (**Figura 1.15**).

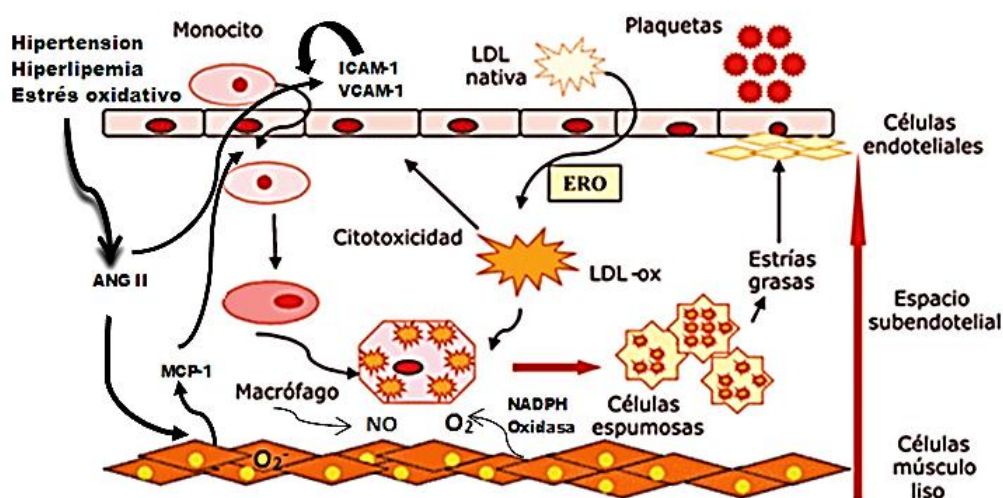


Figura 1.15. Disfunción endotelial (adaptado de Delgado y Martínez, 2009¹⁶³).

Posteriormente tiene lugar la proliferación y migración hacia la íntima de células musculares lisas y la necrosis de células espumosas apareciendo la placa fibrosa. Finalmente, en estadios avanzados, se forman placas maduras llamadas placas de ateroma. En todas las etapas de la aterogénesis se evidencian procesos inflamatorios.

Así mismo, la Ang II participa en la inducción de la respuesta inflamatoria alterando la permeabilidad del endotelio y dando lugar a moléculas de adhesión y quimioquinas. Este péptido también favorece la migración y proliferación de las células musculares lisas, y participa en la inestabilidad de la placa y en la trombogenicidad de la misma alterando el balance de coagulación y fibrinólisis²⁰⁴.

El factor de transcripción NF- κ B es clave en la regulación de la inflamación. Su activación por la Ang II es mediada en parte por la activación de la NADPH oxidasa y el aumento de radicales libres. Así, en situaciones de estrés oxidativo se produce la transcripción de múltiples genes proinflamatorios. No obstante, estas citoquinas pueden participar en la activación de NF- κ B y por lo tanto regular otros muchos genes dependientes de NF- κ B. Por otro lado, los productos de estrés oxidativo pueden producir translocación y activación de NF- κ B, mientras que los antioxidantes pueden bloquear la fosforilación de I κ B (inhibidor de NF- κ B), evitando la liberación de NF- κ B dentro del núcleo celular donde puede unirse a regiones reguladoras de ciertos genes.

1.5.2.3 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE ANTOCIANOS

Tras los diversos estudios epidemiológicos que relacionan inversamente el consumo de vino tinto con biomarcadores inflamatorios²⁰⁵⁻²⁰⁷, se presta una mayor atención a los antocianos y a otros fenoles. En relación a la inflamación, algunos autores han encontrado un efecto inhibitor de la secreción de óxido nítrico de los antocianos en células monocito-macrófago que habían sido pre o cotratadas con INF- γ y TNF- α ^{208, 209}. La pelargonidina es capaz de inhibir la síntesis de la proteína iNOs y la expresión del ARNm, así como la producción de NO de forma dosis-dependiente en macrófagos expuestos a un estímulo inflamatorio (LPS), es más, es capaz de inhibir la activación del factor de transcripción NF- κ B²¹⁰. Otro estudio con cianidina-3-glucósido y sus metabolitos, cianidina y ácido protocatéquico, ha demostrado la inhibición de mediadores inflamatorios como el TNF- α y el NO, así como la inactivación de NF- κ B en macrófagos activados con un estímulo inflamatorio (LPS)²¹¹. En macrófagos, extractos de mora y frambuesa ricos en antocianos también han suprimido la síntesis de NO inducido por marcador inflamatorio^{146, 212}. Sin embargo, García-Alonso *et al.*¹⁸⁸ no

encontró efecto de los antocianos aislados sobre la producción de NO o la secreción de TNF- α . En un reciente estudio *in vitro* donde los macrófagos han sido tratados con extracto de grosella previa estimulación con LPS, se ha atribuido la disminución en los niveles de ARNm, de TNF- α , IL-1 β e iNOs a una reducción en la activación del factor de transcripción NF- κ B, sin embargo, estas observaciones no se observaron *in vivo*²¹³.

Por otro lado, los antocianos han evidenciado un efecto protector frente a la inflamación mediante la supresión de la secreción de MCP-1 en distintos modelos celulares endoteliales^{99, 214, 215}. Además, se ha descrito que los antocianos pueden modular los procesos inflamatorios por la supresión de la expresión de moléculas de adhesión al endotelio²¹⁵⁻²¹⁷.

La inhibición de la ECA es otro factor clave en la prevención aterosclerótica y su inhibición puede ser mediada por flavonoides mediante la unión de los grupos hidroxilo con el átomo de zinc del centro activo de la ECA. De hecho, la inhibición de la ECA ya ha sido observada con delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido²¹⁸. Interesante es el estudio en células endoteliales donde el extracto de antocianos inhibe a la ECA, pero no sus antocianidinas aisladas²¹⁹.

1.5.3 PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR POR ANTOCIANOS

La ECV es una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el 2020 la ECV representará casi las tres cuartas partes del total de defunciones. En España, tres de cada diez fallecimientos se deben a una ECV. Así lo muestran los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) de 2010 que ponen de manifiesto que la ECV es la responsable del 31,2% (119.063) de las muertes.

La ECV puede considerarse una cascada fisiopatológica inducida por la presencia de factores de riesgo como la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes y el tabaquismo. Estas condiciones pueden producir estados como la disfunción endotelial y la aterosclerosis seguidos por síndromes clínicos.

La **arteriosclerosis** es la principal causa de ECV y resulta de la oclusión trombótica de las arterias. La más frecuente de estas enfermedades es la **aterosclerosis**, la cual se produce como consecuencia de la rotura de una placa de ateroma generada por disfunción endotelial e inflamación vascular crónica, que en parte son producidas por un estado de estrés oxidativo del organismo, a causa de un desequilibrio entre EROS y

antioxidantes, siendo el ONOO^- una de las ENOS de mayor efecto sobre el sistema cardiovascular. Es conocido que la progresión de la placa de ateroma genera también por sí misma inflamación y estrés oxidativo. Además, los mecanismos como la regulación génica y la modulación de señales celulares deben estar implicados en procesos antiinflamatorios asociados con la prevención de ECV.

Estudios epidemiológicos relacionan inversamente la incidencia de ECV con el consumo de frutas y verduras ricas en polifenoles²²⁰. Es más, el bloqueo del sistema renina-angiotensina en modelos de daño vascular previene el desarrollo de arteriosclerosis, no sólo por su efecto antihipertensivo sino a través de sus propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas y antioxidantes²²¹.

1.5.3.1 EFECTO CARDIOPROTECTOR MEDIADO POR RECEPTORES ESTROGÉNICOS

La incidencia de ECV en la mujer premenopáusica es baja y muchos estudios sugieren que los estrógenos reducen los riesgos cardiovasculares²²²⁻²²⁴. Los mecanismos incluyen cambios favorables asociados al metabolismo de los lípidos, modulación de la síntesis de óxido nítrico y de los factores de coagulación, liberación de factores relajantes en las células endoteliales, modificación de la reactividad de las células del músculo liso en los vasos sanguíneos, regulación de la expresión génica de receptores de angiotensina e inhibición de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión, eventos descritos como cardioprotectores²²⁵⁻²²⁷.

Los efectos del estradiol son mediados por el receptor estrogénico- α (ER- α) y el receptor estrogénico- β (ER- β), dos miembros de la superfamilia de receptores nucleares que son codificados por dos genes distintos. Ambos han sido identificados en células endoteliales, músculo liso vascular y en la matriz extracelular, sin embargo el ER- α predomina en músculo liso y el ER- β en endotelio²²⁸.

Cuando un ligando se une a los receptores estrogénicos se produce una dimerización seguida de la transcripción de genes diana ya sea mediante la unión a elementos reguladores de DNA o por la modulación de la expresión de otros factores de transcripción, NF- κ B (**Figura 1.16**). Así, los estrógenos pueden inhibir a NF- κ B, evitando la expresión de mediadores proinflamatorios que provocarían una cascada de citoquinas implicadas en la inflamación^{226, 229-231}. También en relación a la inflamación, los estrógenos regulan el metabolismo de lípidos disminuyendo las LDL en sangre. Además, regulan la actividad de la enzima superóxido dismutasa y la captación de radicales libres inhibiendo la oxidación de LDL²³².

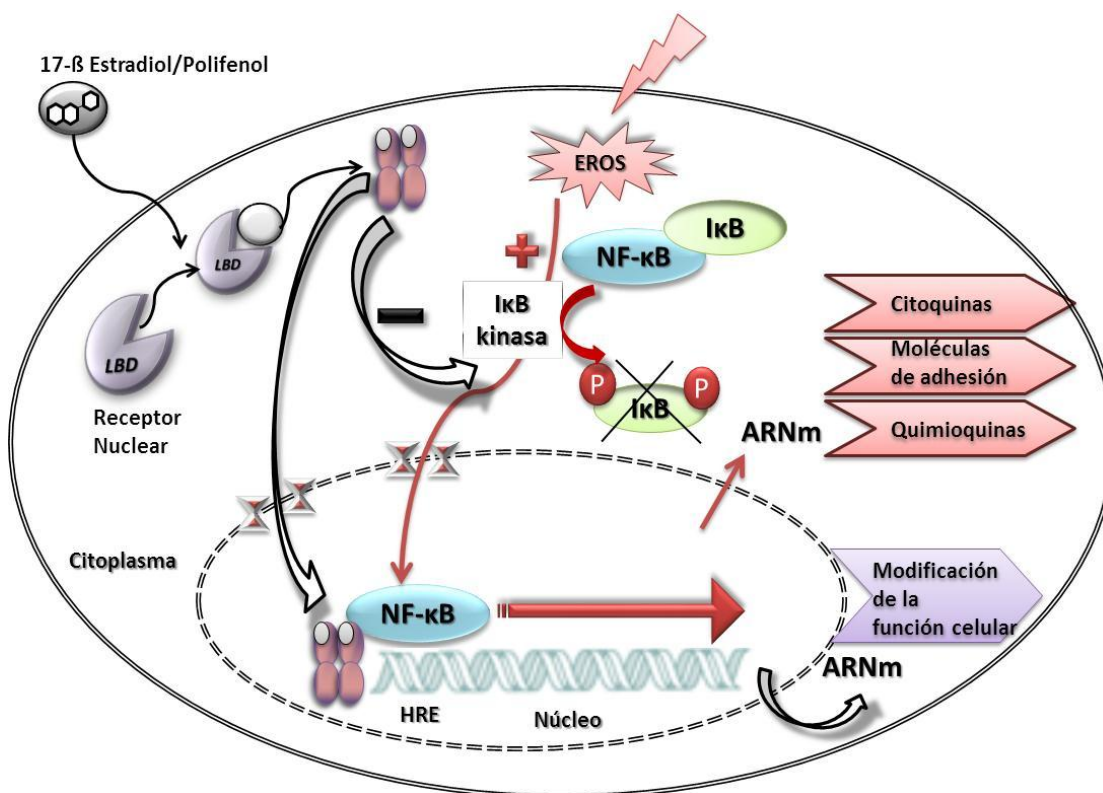


Figura 1.16. Mecanismo de acción mediado por Receptores Estrogénicos. La unión de fitoestrogenos a dominios de unión al ligando (LBD) del receptor nuclear produce su dimerización y translocación al núcleo donde se une a elementos de respuesta a hormonas (HRE) del ADN. El dímero formado en el citoplasma también modula la actividad de factores de transcripción como NF-κB.

Otro componente importante del daño vascular que es modulado por los estrógenos es la alteración de la producción de óxido nítrico. En células endoteliales el óxido nítrico es sintetizado por eNOS y puede ser regulado por receptores estrogénicos produciendo vasodilatación. Además, los estrógenos disminuyen la Ang II^{233, 234}.

1.5.3.2 ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DE ANTOCIANOS

Algunos polifenoles han mostrado características típicas de fitoestrógenos, que son compuestos no esteroideos que poseen actividad estrogénica y se asocian con un menor riesgo de ECV²³⁵. El efecto de los flavonoides en el sistema vascular mediante estrógenos está bien establecido²³⁶. Algunas evidencias en la literatura demuestran la actividad estrogénica de los antocianos, por ejemplo, los aglicones de pelargonidina, cianidina y delphinidina ejercen afinidad de unión al ER-α y pueden activar la expresión de genes dependiente de estrógenos²³⁷. En el análisis de la propiedades estrogénicas del vino tinto, se observó mayor actividad agonista en ER-β que en ER-α²³⁸. Otro estudio más reciente, ha evidenciado que los polifenoles del vino, especialmente la delphinidina, ejercen un efecto beneficioso en el endotelio por unión a ER-α, además estudios de

“docking” sugieren la interacción directa de la delphinidina con sitios de unión del ER- α ²³⁹. De acuerdo con estas evidencias, Simoncini *et al.*²⁴⁰ han sugerido que parte del efecto protector del vino en el endotelio es mediado vía receptores estrogénicos, mediante la cual polifenoles como el ácido sirínico y la malvidina pueden activar eNOs.

1.6 IMPLICACIÓN DE LAS BACTERIAS COLÓNICAS EN LA SALUD

La flora del colon ejerce un importante papel en el mantenimiento de la salud del hospedador²⁴¹. El colon es un ecosistema en el cual las bacterias se benefician del flujo de nutrientes y el hospedador de los efectos fisiológicos de las bacterias, tales como su capacidad para sintetizar vitaminas y metabolizar sustancias no absorbidas; inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y estimular el sistema inmune²⁴² (**Tabla 1.4**):

Tabla 1.4. Efectos fisiológicos de las bacterias intestinales.

ACTIVIDAD BACTERIANA	MECANISMO DE ACCIÓN
Metabolismo	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de vitaminas. • Metabolismo de sustancias no absorbidas. • Metabolismo lipídico. • Absorción de minerales.
Barrera	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico, bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato). Reducen el número de células patógenas afectando al metabolismo bacteriano y/o la producción de toxinas. • Disminución del pH favoreciendo el decremento de bacterias patógenas. • Competición con patógenos por sitios de adhesión de la superficie epitelial. • Competición por nutrientes.
Sistema inmunológico	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulación del sistema inmune innato (activación de macrófagos y descenso TNF-α en alergias). • Estimulación del sistema inmune adquirido (Inmunoglobulina A (Ig A) y células β).

Dentro del entorno intestinal se encuentran bacterias consideradas beneficiosas para la salud del hospedador, como lactobacilos y bifidobacterias, y algunas que pueden ser perjudiciales como *Clostridium*. Normalmente existe un equilibrio entre las distintas

comunidades de la microbiota intestinal, sin embargo, puede ser alterado por factores endógenos y exógenos (antibiótico, dieta, estrés) creando un desequilibrio a favor de bacterias perjudiciales que puede desembocar en diversas enfermedades. Estas evidencias han llevado al interés por conseguir la modificación y restauración de la microbiota normal en condiciones de desequilibrio, así como a su mantenimiento, mediante el uso de probióticos, microorganismos vivos que ingeridos en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable al huésped²⁴³. El crecimiento y metabolismo de la mayoría de las especies depende de la disponibilidad del sustrato, el cual proviene en su mayoría de la dieta. Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles, que afectan al hospedador de manera beneficiosa mediante la estimulación del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de especies presentes en el colon²⁴⁴, y por tanto pueden favorecer el mantenimiento de la salud.

El efecto beneficioso de las bacterias sobre la salud depende de cada una de las cepas, así como de las características inherentes del huésped. Entre otros efectos se pueden citar:

I. Efectos beneficiosos en el tracto gastrointestinal

a) Diarrea

La infección por rotavirus es una causa común de diarrea infantil. Diversos estudios sugieren que *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* y *Bifidobacterium lactis* son efectivos tanto en el tratamiento como en la prevención de este tipo de diarrea²⁴⁵. En el caso de la diarrea asociada a antibióticos, ésta se produce por una disminución en el número de bacterias intestinales beneficiosas, lo que a su vez ocasiona una disminución de ácidos grasos de cadena corta, así como un aumento de patógenos oportunistas como *Clostridium difficile* y su toxina. *L. rhamnosus* GG, *S. boulardii*, *L. casei* y *L. acidophilus* son eficaces tanto en la prevención como en el tratamiento de diarrea producida por antibióticos mediante la estimulación de factores inmunes y la secreción de mucina²⁴⁶. También se ha descrito que la llamada diarrea “del viajero”, causada generalmente por *E. coli* enterotoxigénica, se puede ver reducida por *L. rhamnosus* GG y *S. boulardii*²⁴⁵. Recientemente, un estudio ha demostrado que *Bifidobacterium longum subsp. longum* es capaz de proteger frente a la infección de *E. coli* 0157:H7 enterohemorrágica a través de la producción de acetato²⁴⁷.

b) Enfermedad inflamatoria intestinal

Es una afección crónica multietiológica, con la que se asocia a *C. difficile* y que causa inflamación del tracto gastrointestinal, entre estas enfermedades se encuentran la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Recientes investigaciones han manifestado que una mezcla de diversas cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* puede aminorar los síntomas^{248, 249}. Además, se ha encontrado un efecto sinérgico en la disminución de citoquinas (TNF- α e IL-1) con el empleo conjunto de *B. longum*, fructooligosacáridos (FOS) e inulina²⁵⁰.

c) Gastritis asociada a H. pylori

Estudios *in vitro* revelan que bacterias lácticas como *L. reuteri* inhiben el crecimiento de *H. pylori*, así como su actividad ureasa para sobrevivir en medio ácido^{251, 252}.

d) Síndrome del intestino irritable

Está constituido por patologías relacionadas con la función intestinal, cursa con dolor abdominal, alta frecuencia de defecación y/o estreñimiento. Se ha observado que la combinación de diversas especies probióticas son capaces de restablecer el funcionamiento intestinal^{248, 253}.

e) Cáncer de colon

Tanto la dieta como algunas bacterias (*Clostridium histolyticum*) y productos metabólicos genotóxicos (aminas) han sido identificados como responsables de la inducción del cáncer de colon. Ciertas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* pueden disminuir la actividad de enzimas microbianos involucrados en la producción de toxinas y carcinógenos, así como la reducción de estos en heces²⁵⁴.

I. Efectos beneficiosos asociados al sistema inmune y alergias

Existen evidencias *in vitro* e *in vivo* que demuestran que cepas de *Lactobacillus* interaccionan con células epiteliales y puede modular no sólo el sistema inmune innato sino también el adquirido^{255, 256}.

II. Efectos beneficiosos en ECV: hipercolesterolemia

Los niveles elevados de colesterol en sangre son un factor de riesgo para la ECV en los primeros estadios de la aterosclerosis. Algunas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentan actividad sobre los ácidos biliares, así como capacidad de

regular la síntesis de colesterol, de manera que pueden reducir el nivel sérico de colesterol^{257, 258}. Además, *Streptococcus faecium* también podría mejorar el perfil lipídico²⁵⁹.

III. Efectos beneficiosos en el tracto genitourinario

Alteraciones en la microbiota urogenital, por ejemplo en la menopausia, facilitan la infección por microorganismos oportunistas como *Candida* y *E. coli*. Ciertas bacterias tienen efecto microbicida debido a la producción de peróxido de hidrógeno. Así, la administración oral de cepas encapsuladas de *L. rhamnosus* y *Lactobacillus fermentum* ha demostrado eficacia en reducir el riesgo de infección del tracto urinario, vulvovaginitis y enfermedades de transmisión sexual²⁶⁰.

1.6.1 MODULACIÓN BACTERIANA MEDIADA POR ANTOCIANOS

Los componentes de la dieta pueden actuar como moduladores del ecosistema intestinal. De hecho, hay multitud de evidencias sobre los efectos prebióticos de los oligosacáridos oligofruktosa e inulina²⁶¹. Las bacterias dependen para su crecimiento de la disponibilidad de sustrato que escapa de la digestión en el tracto gastrointestinal, del potencial redox, del pH y del oxígeno. Las bacterias lácticas y las bifidobacterias son principalmente fermentadoras de hidratos de carbono para producir ácidos orgánicos que disminuyen el pH y como consecuencia ejercen un efecto antibacteriano y también convierten el NH_3 en NH_4^+ . Además, cepas de los géneros *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* utilizan los hidratos de carbono para producir ácidos grasos de cadena corta. Estos ácidos están relacionados con la inhibición de la proliferación celular, la conversión de colesterol en ácido biliar, así como con una mayor absorción de minerales. Por otro parte, si el principal nutriente que llega al colon son proteínas, su fermentación por ciertas bacterias puede producir sustancias tóxicas como NH_3 , aminas, fenoles, tioles e indoles.

Los antocianos son compuestos cuya absorción en el intestino delgado es limitada y por lo tanto muchos de ellos llegan al colon, donde pueden influir en la microbiota de varias maneras. Hasta la fecha, se han demostrado las propiedades antimicrobianas de extractos fenólicos con bacterias patógenas aisladas^{134, 159, 262-265}. Por ejemplo, los extractos de bayas han demostrado ser capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* y *Staphylococcus*. Los arándanos, ricos en antocianos,

también presentan propiedades antimicrobianas contra *L. monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7 y *S. typhimurium*.

Aunque aún son escasos los estudios que prueban la modulación de la flora intestinal por parte de compuestos fenólicos²⁶⁶⁻²⁶⁹, hay algunos estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se muestra que tanto el consumo de chocolate como la fermentación de flavonoles dan lugar a un aumento de *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., mientras que el número de *Clostridium* spp. disminuye. Paralelamente, en los estudios realizados *in vivo*, se observa una disminución de marcadores inflamatorios en plasma asociada a los cambios en la microbiota arriba descritos^{266, 267}. De hecho, el efecto prebiótico observado en flavonoles también ha sido sugerido para los antocianos, por ejemplo, en ratas alimentadas con polifenoles del vino, entre los que se encuentran los antocianos, se encontraron como géneros mayoritarios en heces *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., mientras que las heces de ratas que no habían sido tratadas con polifenoles presentaron un perfil mayoritario en *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. y *Propionibacterium* spp.²⁷⁰. Más recientemente, se ha investigado el efecto del extracto de granada, que previamente había demostrado actividad antimicrobiana en patógenos, en la modulación de bacterias mediante un sistema de fermentación que simula las condiciones del colon. Los resultados demostraron un aumento del crecimiento de *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. unido a un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta^{271, 272}. De acuerdo con este estudio, otros autores han observado en heces de ratas alimentadas con extractos de mora un aumento de bacterias beneficiosas (*Bifidobacterium* spp., y *Lactobacillus* spp.), así como una disminución de bacterias potencialmente perjudiciales (*Bacteroides* spp. y *Clostridium* spp.). Es más, apreciaron un aumento de la actividad β -glucosidasa debida a la estimulación del crecimiento de bifidobacterias y bacterias lácticas, así como una disminución de la actividad β -glucuronidasa, asociada con el riesgo de cáncer de colon²⁷³.

! : | : | : | .

HIPÓTESIS

HIPOTESIS

2 HIPÓTESIS

Tanto estudios epidemiológicos como ensayos *in vivo* han sugerido que un elevado consumo de frutas y verduras está asociado con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Recientemente se ha demostrado que el vino tinto y los frutos rojos, fuentes dietéticas importantes de antocianos, ejercen propiedades biológicas beneficiosas en el hombre, principalmente por sus funciones antioxidantes. Sin embargo, las concentraciones de antocianos alcanzadas en plasma no parecen justificar dichos efectos.

Por ello, en la presente Tesis Doctoral, se planteó el poner de manifiesto que los metabolitos derivados de antocianos, tanto de su metabolismo como de la acción de la flora intestinal, tuvieran un efecto a este nivel. Además, los mecanismos de acción de estos compuestos deben ser debidos no sólo a la actividad antioxidante ejercida individualmente, sino a la actividad antioxidante producida como consecuencia de su interacción, así como por la regulación de procesos celulares ya que los polifenoles en general demuestran una gran afinidad para unirse a receptores, transportadores, factores de transcripción y por regulación de la expresión génica.

3 OBJETIVOS

El **objetivo general** de la Tesis ha sido determinar el metabolismo de los antocianos, así como la actividad biológica de dichos antocianos y sus metabolitos.

❖ Para alcanzar este objetivo se desarrollaron varios **objetivos parciales**:

- I. Caracterización de los principales metabolitos de los antocianos generados por la acción de la flora intestinal, así como por degradación química.
- II. Evaluación de la influencia de los antocianos en la modulación de la flora intestinal.
- III. Determinación de la interacción entre flavonoides y su influencia en la capacidad antioxidante.
- IV. Determinación de la capacidad antiinflamatoria ejercida por antocianos y sus metabolitos por su implicación en la prevención del desarrollo aterosclerótico, a través de la medida de citoquinas, moléculas de adhesión y quimioquinas en diferentes modelos celulares, así como por inhibición de la ECA.
- V. Determinación de la actividad estrogénica por su implicación en el desarrollo aterosclerótico, mediante el estudio de la afinidad por receptores estrogénicos.

MATERIALES Y
MÉTODOS

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Tanto la metodología como los materiales empleados en los diversos trabajos experimentales se describen detalladamente en los apartados Materiales y Métodos de los artículos indexados. La finalidad de esta sección es reforzar su comprensión.

4.1 EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS Y SUS METABOLITOS

4.1.1 *EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE MALVIDINA-3-GLUCÓSIDO*

El monoglucósido de malvidina ha sido obtenido de las lías, un subproducto de la industria del vino que fue generosamente proporcionado por Bodegas Osborne y Capilla del Fraile (Toledo, España).

El extracto acuoso que forman las lías fue filtrado con un embudo Büchner y lavado con *n*-hexano hasta eliminar las sustancias liposolubles. A continuación, el *n*-hexano se eliminó por completo en un rotavapor a 35 °C y se liofilizó.

La malvidina-3-glucósido fue aislada mediante RP-HPLC semipreparativa (Waters, Milford, USA) equipado con un sistema de doble bomba Delta 600 conectado a un detector UV-Vis y un colector de fracciones. La columna utilizada fue Nova Pack HR C18, 4 µm, 300 × 7,8 mm (Waters). El extracto liofilizado (10 g) fue diluido en 100 mL de agua destilada y filtrado a través de un filtro de 0,45 µm. Los disolventes utilizados como fases móviles fueron ácido fórmico al 4,5% (A) y acetonitrilo de grado analítico (B) en un flujo de 4 mL/min. El gradiente aplicado fue el siguiente: 10-15% B durante 2 min, 15-20% B durante 4 min, 20-25% B durante 9 min, isocrático 25% B durante 2 min. La detección se realizó fijando la longitud de onda a 520 nm. Una vez eluidas las fracciones se reunieron, concentraron en rotavapor, redisolviéron en agua y se liofilizaron y conservaron a -20 °C. La pureza e identificación de la malvidina-3-glucósido fue comprobada mediante HPLC-DAD (**Artículo 4**).

4.1.2 *IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS Y SUS METABOLITOS*

Tanto la identificación como la cuantificación de los antocianos y metabolitos existentes en las muestras se realizó mediante HPLC (Agilent 1100 en **Artículo 1**)

(Agilent 1200 en **Artículo 4**) provistos de una bomba cuaternaria y un detector de fotodiodos. La muestra fue centrifugada (10.000 x g/5 min/4 °C), filtrada a través de un filtro de 0,45 µm e inyectada en el sistema HPLC. Las columnas utilizadas como fase estacionaria para HPLC de fase reversa fueron Phenomenex Luna C18 (5 µm; 200 Å; 4,6 x 150 mm) (**Artículo 1**) y Ultrabase C18 (5 µm; 4,6 mm x 150 mm) (**Artículo 4**), ambas termostatzadas a 25 °C. Los eluyentes utilizados fueron ácido fórmico 4,5% (A) y acetonitrilo de grado analítico (B) en un flujo de 0,5 mL/min. Comenzando con 10% de B el gradiente utilizado fue el siguiente: desde 10 a 20% de B en 20 min, desde 20 a 25% B en 10 min, desde 25 a 35% B en 10 min e isocrático 35% B en 10 min. La detección se realizó en un detector de diodos seleccionando 280, 330, 370, 440 y 520 nm como longitudes de onda. Los antocianos fueron detectados a 520 nm y sus áreas fueron referidas a las curvas de calibración obtenidas con los respectivos patrones. Las áreas de los ácidos fenólicos también fueron referidas a las curvas de calibración preparadas con patrones (**Artículos 1 y 4**).

Para una mejor identificación y cuantificación de los ácidos fenólicos se puso a punto un nuevo método cromatográfico (**Artículo 4**) cuyos eluyentes fueron ácido acético 2,5% (A), acetonitrilo (B), agua ultrapura (C) y ácido acético 2,5%/acetonitrilo (90:10) (D) en un flujo de 0,5 mL/min. El gradiente utilizado fue el siguiente: desde 100% A a 100% D en 3 min, desde 100% D a 1% B en 4 min, isocrático 1% B en 3 min, desde 1 a 15% B en 20 min, desde 15 a 60% B en 5 min, isocrático 60% B en 5 min. La detección se realizó en las longitudes de onda de 280, 330 y 370 nm.

La identificación de antocianos y ácidos fenólicos se confirmó mediante una segunda detección esta vez en HPLC-MS. El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas Agilent 1100 equipado con una fuente de API que utiliza una interfase de ionización por electrospray (ESI), así como un cuadrupolo simple G1946D Q-LC/MS (**Artículo 4**) y un Finnigan LCG (**Artículo 1**) como detectores de masas. Las condiciones seguidas en el **Artículo 1** fueron las descritas por de Pascual-Teresa *et al.*²⁷⁴: las fases móviles fueron trifluoroacético 0,1% (A) y acetonitrilo (B) en un flujo de 0,5 mL/min y con el siguiente gradiente: isocrático 10% B en 5 min, de 10 a 15% B en 15 min, isocrático 15% B en 5 min, de 15-18% B en 5 min y de 18 a 35% B en 20 min. Para el **Artículo 4** los eluyentes usados fueron agua ultrapura (A), acetonitrilo (B), ácido fórmico 1% (C) y ácido fórmico 1%/acetonitrilo (90:10) (D) en un flujo de 0,5 mL/min. Comenzando con 100% de C, el gradiente fue el siguiente: de 100% de C a 100% de D en 3 min, de 100%

de D a 1% de B en 4 min, isocrático 1% B en 3 min, desde 1 a 12% de B en 20 min, desde 12 a 50% B en 5 min, isocrático 50% B en 5 min y de 50% B a 100% C en 2 min.

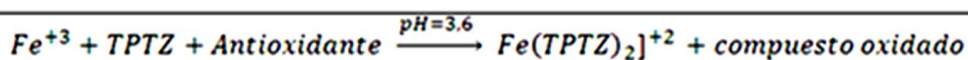
El espectro se registró en modo positivo y las condiciones para el análisis fueron: temperatura del capilar 180 °C, voltaje del capilar 3 V, el gas auxiliar y el gas envolvente consistió en una mezcla de nitrógeno y helio. El espectrómetro se programó con un espectro total de masas comprendidas entre 120 y 1500 amu (full scan), otro correspondiente al espectro total de masas generado tras la ruptura del ion mayoritario del primer barrido por aplicación de una energía de colisión (MS^2) y un tercero (MS^3) y cuarto (MS^4) correspondientes a los espectros de masas generado tras la ruptura de fragmentos mayoritarios. Adicionalmente se incluyeron los patrones estándar de antocianos y ácidos fenólicos para mejorar la identificación.

4.2 PROPIEDADES BIOACTIVAS

4.2.1 *ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE*

4.2.1.1 *CAPACIDAD DE REDUCCIÓN FÉRRICA (FRAP)*

La capacidad antioxidante de los flavonoides fue determinada mediante el ensayo FRAP puesto a punto por Benzie y Strain²⁷⁵ con algunas modificaciones. El método se basa en la capacidad de un compuesto de donar un electrón reduciendo el ión férrico a ferroso en medio ácido. La adición del compuesto 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ) se une al ión ferroso formado un compuesto de color azul que se cuantifica a 593 nm.



El reactivo FRAP fue preparado mezclando 0,3 M de tampón de acetato (pH 3,6), 10 mM TPTZ en 40 mM HCl y 20 mM FeCl₃ en una proporción de 10:1:1 (v/v/v), respectivamente. El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos donde se añadieron 10 µL de los flavonoides individuales a 100 µM o 5 µL a 200 µM de cada flavonoide en la mezcla. Aquellas combinaciones de dos flavonoides donde la capacidad antioxidante fue incrementada, con respecto a las individuales, fueron seleccionadas para un segundo ensayo en el cual se probaron diferentes concentraciones

en ratios (3:1, 2:1 y 1:1) con una concentración final fija (200 μM). Después de 15 min de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ y agitando levemente, la absorbancia fue medida a 593 nm. Los resultados se compararon con una curva de calibración estándar y se expresaron como equivalentes de trolox (**Artículo 2**).

4.2.1.2 SECUESTRO DEL RADICAL DPPH \cdot

DPPH \cdot es un radical estable de color violeta debido a la deslocalización de un electrón que presenta un máximo de absorción a 517 nm. Cuando un compuesto antioxidante reduce el radical donando un electrón, disminuye la absorbancia por la formación de un compuesto no radicalario de color amarillo (**Figura 4.1**).

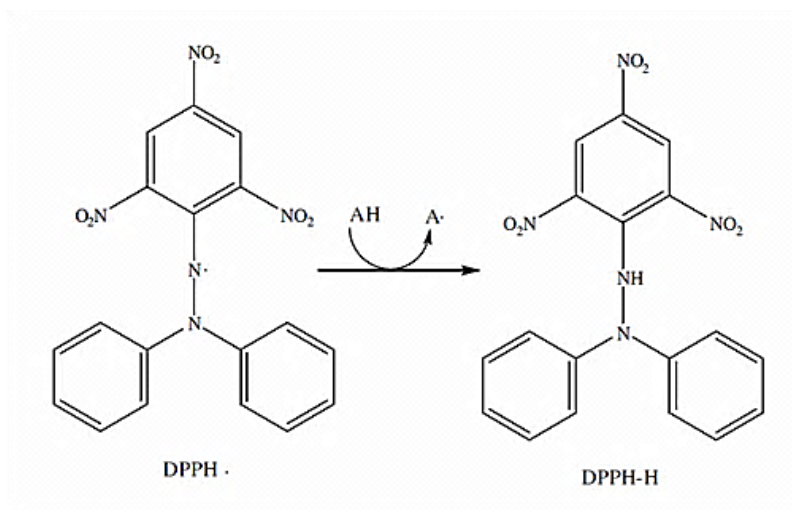


Figura 4.1. Secuestro del radical DPPH \cdot por un antioxidante (AH).

Este método, desarrollado por Brand-Williams²⁷⁶, fue modificado por nuestro grupo hasta alcanzar las condiciones óptimas para ser llevado a cabo en placa de 96 pocillos. Finalmente, 10 μL de un flavonoide individual o 5 μL de cada flavonoide en mezcla fueron añadidos para alcanzar un rango de concentraciones entre 100 y 500 μM en una placa de 96 pocillos. A continuación se añadieron 290 μL del radical DPPH \cdot (100 μM) disuelto en metanol y después de 1 h de incubación en la oscuridad se midió la absorbancia a 517 nm. Los resultados fueron expresados como EC₅₀ (μM) obteniéndose del porcentaje de DPPH \cdot remanente frente a la concentración de flavonoide. Los valores de EC₅₀ representan la concentración de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH \cdot en un 50% (**Artículo 2**).

4.2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA)

La ECA actúa en el sistema renina-angiotensina convirtiendo la Ang I en Ang II (Figura 4.2). Su inhibición es la finalidad de algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la hipertensión como el captoprilo o el enaprilato. La técnica se basa en la hidrólisis de un sustrato fluorescente por la acción de la ECA. La fluorescencia generada por la liberación del producto (el grupo O-aminobenzoilglicina) es disminuida por compuestos con capacidad de inhibir a la ECA y es analizada en un fluorómetro²⁷⁷. Para ello, la solución de la ECA (peptidil-dipeptidasa A, EC 3.4.15.1) fue diluida en 0,15 M del tampón Tris (pH 8,3) que contenía 0,1 μM ZnCl_2 con 0,04 U/mL de enzima como concentración final. Un total de 40 μL de esta solución enzimática (o tampón para el blanco) fueron añadidos a una microplaca con otros 40 μL de muestra (M) o de agua en el caso del blanco (B) o del control (C). La reacción comenzó al añadir 160 μL de 0,45 mM del sustrato fluorescente (o-Abz-Gly-p-Phe(NO₂)-Pro-OH) disuelto en 150 mM de Tris (pH 8,3), que contenía 1,125 M NaCl. Después de incubar 30 min a 37 °C se midió la fluorescencia de excitación y emisión a 350 y 420 nm, respectivamente. La actividad de inhibición fue expresada como concentración requerida para inhibir la actividad de la ECA un 50% (IC_{50}) (Artículo 3).

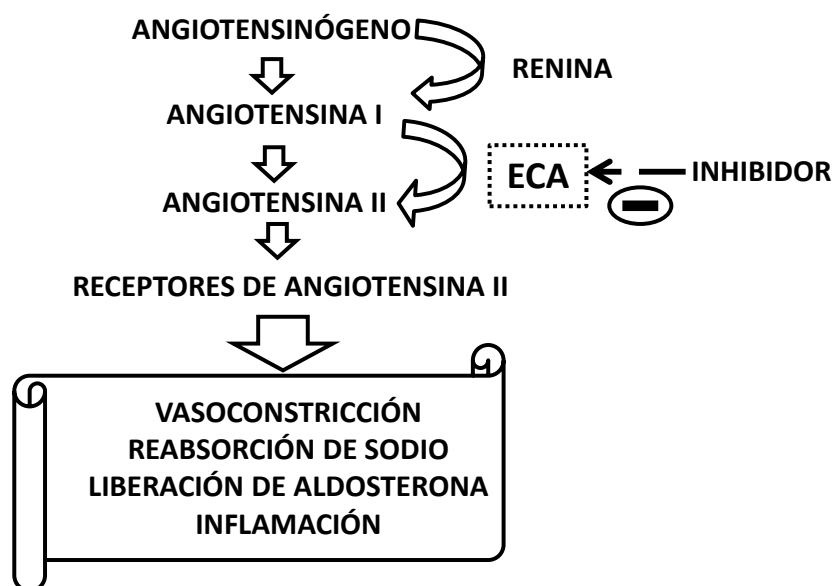


Figura 4.2. Efectos fisiológicos desencadenados por la ECA.

4.2.3 ENSAYO COMPETITIVO DE UNIÓN A ER- α y ER- β

La capacidad de unión de los antocianos y ácidos fenólicos a receptores estrogénicos fue determinada mediante un ensayo de radioactividad basado en la capacidad de los compuestos de competir por su unión a ER- α y ER- β con estradiol marcado. Para ello, se utilizaron ambos receptores puros a 2,4 nM, 5 nM de estradiol marcado con tritio ([2,4,6,7,16,17-3 H] estradiol), estradiol sin marcar, los antocianos y ácidos preparados en DMSO (0,5%) y diluido en tampón fosfato salino (PBS) con 0,15% Tween 20. El mismo volumen de cada analito en un rango de concentración entre 1 y 200 μ M, Estradiol-H3* y receptor se mezclaron en un volumen final de 150 μ L. La mezcla se incubó a 23 °C durante 4 h para permitir la unión al receptor. Seguidamente se añadieron 50 μ L de carbón (carbón 0,1 g/mL + BSA (albúmina sérica bovina) 0,02 g/mL) a las muestras y se mantuvieron en hielo 15 min antes de ser centrifugadas a 6.000 x g durante 5 min para eliminar el exceso de Estradiol-H3* no unido a receptor. Una alícuota de este sobrenadante (150 μ L) fue añadido a 4 mL de líquido de centelleo para poder ser medido en un Contador de centelleo líquido (Beckman, LS 6500). Los resultados fueron expresados como porcentaje de unión de Estradiol-H3* al receptor estrogénico frente al logaritmo (log) de la concentración del competidor. Los valores de IC₅₀ representan la concentración de la sustancia requerida para desplazar un 50% la unión de Estradiol-H3* al receptor estrogénico (**Artículo 3**).

4.2.4 DETERMINACIÓN DEL MODO DE UNIÓN A ER- α y ER- β : ESTUDIO “DOCKING”

La predicción teórica del modo de unión a los receptores estrogénicos puede dar una estimación de su afinidad real. Se ha llevado a cabo el estudio teórico del modo de unión de los ligandos (antocianos y ácidos) a los dos subtipos de receptor estrogénico, α y β , utilizando técnicas computacionales de acoplamiento (docking). Como macromolécula se han seleccionado las estructuras cristalográficas de los dos subtipos de receptor en complejo con genisteína (código PDB: 1x7r para ER- α y 1x7j para ER- β). La molécula de agua cristalográfica próxima a Arg394 (ER β Arg346) y Glu353 (ER β Glu305) fue mantenida por considerarse parte del sitio de unión. Los ligandos fueron construidos mediante el programa Sybyl 7.2 (www.tripos.com). A continuación, se llevó a cabo la optimización de la geometría y el cálculo de las cargas puntuales de todas las moléculas mediante el programa Gaussian (versiones 98 y 03,

www.gaussian.com) usando para ello un nivel de cálculo B3LYP/3-21G*. Una vez que los compuestos estuvieron optimizados, se asignaron los tipos de átomos y los tipos de enlace, y se generaron los archivos mol2. La geometría de la macromolécula fue refinada mediante el empleo del programa Sybyl. El programa AutoDock 3.1 fue empleado para llevar a cabo los estudios de docking. El protocolo llevado a cabo, y que se describe a continuación, fue común para todos los ligandos. Las regiones en las que estábamos interesados se definieron considerando una caja de 80, 80 y 90 puntos en los ejes x, y, y z. Las cajas fueron construidas centrándolas en la posición que ocupa la genisteína dentro del sitio de unión, incluyendo los residuos que se sabe que son cruciales para la unión. Para el cálculo de los mapas de energía se empleó un espaciado de la malla de 0,375 Å y una función de la constante dieléctrica dependiente de la distancia. El estudio de docking se llevó a cabo empleando el algoritmo genético Lamarckiano, dejando todos los torsionales flexibles. El programa buscó hasta un máximo de 100 conformaciones y el procedimiento fue repetido 100 veces (runs). Para el resto de los parámetros se emplearon los valores por defecto. Las soluciones de docking generadas se agruparon en clusters. El análisis de los clusters se llevó a cabo empleando una tolerancia del RMSD (“Root Mean Square Deviation”) de 1,0 Å. Los clusters se colocaron por orden de energía, considerando el de menor energía dentro de cada cluster (**Artículo 3**).

4.3 ENSAYOS CON BACTERIAS INTESTINALES

Debido a que los antocianos son compuestos que en su mayoría alcanzan el colon donde habitan numerosas poblaciones de bacterias, sus interacciones pueden ejercer un papel clave en los efectos beneficiosos encontrados en el hombre.

Se realizaron dos tipos de ensayos *in vitro* con bacterias intestinales: uno con cepas puras y otro con muestras fecales.

4.3.1 ENSAYOS CON CEPAS PURAS DE BACTERIAS INTESTINALES

4.3.1.1 OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS DE CÉLULAS ENTERAS O EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS BACTERIANAS

Cepas de *L. acidophilus*, *L. casei*, *Lactobacillus plantarum* y *B. lactis* fueron inoculadas al 1% en caldo de cultivo MRS (Pronadisa, Barcelona, Spain) que fue

suplementado con 0,5% de lactosa, 0,2% de Tween 80, 0,8% de hidrolizado de caseína ácida y 0,05% de cisteína. *L. acidophilus* y *B. lactis* fueron incubadas en condiciones anaeróbicas durante 18 h a 37 °C, mientras que las cepas de *L. casei* y *L. plantarum* fueron incubadas aeróbicamente durante 18 h a 30 °C. Una vez crecida cada cepa en sus condiciones óptimas, las células se recogieron mediante centrifugación (10.000 x g, 15 min, 4 °C) y se lavaron dos veces con 50 mM de PBS a pH 6,5. Para obtener los concentrados de células enteras, las células lavadas se resuspendieron en PBS hasta conseguir una DO₆₀₀~0,5 e inmediatamente se usaron para determinar su actividad β-glucosidasa. Para obtener los extractos libres de células o intracelulares, las células lavadas se congelaron a -80 °C, se resuspendieron en 500 μL de PBS y se mezclaron con perlas de vidrio estériles (1:1, p/v). Finalmente, se agitaron para lograr la rotura mecánica de la célula y se centrifugaron. El sobrenadante fue guardado a -80 °C hasta su análisis. El contenido proteico de los extractos fue determinado mediante el método Bradford (**Artículo 1**).

4.3.1.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GLUCOSIDASA EN BACTERIAS

Debido a la presencia de enlaces β-glicosídicos en los antocianos es importante determinar la actividad β-glucosidasa de las bacterias.

La reacción se llevó a cabo con 450 μL de 1 mM *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranososa como sustrato y 50 μL de células enteras, extractos libres o con un estándar de la enzima β-glucosidasa que fueron incubados a 40 °C. La reacción se paró adicionando 500 μL de NaOH 0,1 M. La cantidad de *p*-nitrofenol liberado se midió a 410 nm por espectrofotometría (**Artículo 1**). Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de β-glucosidasa que libera 1 μmol de *p*-nitrofenol del sustrato por min. En los experimentos con extractos libres de células, la actividad fue expresada como unidades de enzima por mg de proteína.

4.3.1.3 DEGRADACIÓN QUÍMICA Y BACTERIANA DE ANTOCIANOS IN VITRO

Lactobacillus acidophilus LA-5, *Lactobacillus casei* LC-01, *Bifidobacterium lactis* BB-12 y *Lactobacillus plantarum* IFPL722 fueron seleccionadas para determinar la degradación bacteriana de los antocianos.

Para determinar la degradación química se mezclaron 5 μL de delfinidina-3-glucósido o malvidina-3-glucósido (10 mM) con 495 μL de PBS, mientras que para determinar la degradación bacteriana se mezclaron 5 μL de delfinidina-3-glucósido o

malvidina-3-glucósido (10 mM) y 50 μ L de células enteras (DO_{600} nm $\sim 0,5$) o extractos libres de células (con la misma concentración de proteínas) diluido en 445 μ L de PBS.

A continuación se incubaron a 37 °C en la oscuridad y se recogieron alícuotas de 100 μ L después de 30 min, 2 y 24 h para las células enteras y después de 1, 5 y 24 h para los extractos libres de células. La reacción se paró añadiendo 100 μ L de metanol que contenía 0,01% de HCl y se centrifugó (10.000 \times g, 10 min, 4 °C). Finalmente las muestras se guardaron a -80 °C hasta su análisis (HPLC) (**Artículo 1**).

4.3.2 ENSAYOS CON BACTERIAS INTESTINALES DE MUESTRAS FECALES

4.3.2.1 INOCULACIÓN DE MUESTRAS FECALES CON SUSTRATOS EN CULTIVO FERMENTATIVO

Las muestras fecales, de 3 individuos diferentes, fueron recogidas el mismo día del experimento y diluidas 1:10 (w/v) con PBS (0,1M; pH 7,4) en condiciones anaeróbicas. Seguidamente se homogeneizaron durante 2 min y la papilla fecal resultante fue usada para la inoculación.

Los vasos de cultivos estériles fueron rellenados con 54 mL de medio estéril con un pH de 7 y gasificados con N₂ durante las 12 h previas al ensayo. Después de este tiempo la temperatura fue ajustada a 37 °C y los vasos fueron inoculados con 6 mL (1%) de papilla fecal. Para simular las condiciones existentes en el colon, el ensayo se llevo a cabo en condiciones anaeróbicas, 37 °C y el pH se mantuvo en 7.

A continuación, cada vaso se inoculó con ácido gálico (150 mg/L y 1000 mg/L), malvidina-3-glucósido (20 mg/L y 200 mg/L) y enocianina (4850 mg/L y 48500 mg/L). Como controles se utilizaron un vaso con el prebiótico de FOS (1%, w/v) (Raftilose P95) y otro sin sustrato.

Durante la incubación se recogieron muestras para la hibridación fluorescente *in situ* (FISH-“Fluorescent In Situ Hybridization”) (0, 5, 10 y 24 h) y para el análisis por HPLC de antocianos y metabolitos (0, 1, 2, 4, 5, 10, y 24 h).

Para el análisis de antocianos, alícuotas de 500 μ L fueron dispensadas en tubos que contenían 500 μ L de metanol con HCl (0,1% v/v) y centrifugadas (13.000 \times g, 10 min). La fracción sobrenadante fue almacenada a -80 °C. La muestra restante fue dispensada (1 mL por duplicado) en tubos que contenían 30 μ L de ácido fosfórico en agua 1:1 (v/v) y centrifugada (13.000 \times g, 10 min). La fracción sobrenadante fue almacenada a -80 °C hasta el análisis de antocianos y ácidos (**Artículo 4**).

4.3.2.2 RECUENTO DE BACTERIAS

A fin de evaluar los cambios bacterianos en las muestras se utilizó FISH. La técnica consiste en realizar una hibridación o unión molecular con una sonda oligonucleotídica o secuencia de DNA de una sola hebra, marcada en su extremo con moléculas fluorescentes, dirigidas a una región específica y conservada el 16S ARNr, produciendo una unión irreversible que se traduce en señales fluorescentes cuando son observadas al microscopio. Para ello se usaron sondas comerciales sintetizadas y etiquetadas con el colorante fluorescente Cy3. Los grupos bacterianos utilizados para su recuento fueron EUB338/II/III para el número total de bacterias; Bif 164 específico para *Bifidobacterium* spp.; Lab 158 para *Lactobacillus-Enterococcus* spp., Erec 482 para el grupo de *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale*; Chis 150 para el grupo *C. histolyticum*; Bac 303 para *Bacteroides* spp.; y Ato 201 para el grupo de especies de *Atopobium-Coriobacterium*.

Los sobrenadantes obtenidos de las muestras tomadas de la fermentación (375 µL) se fijaron en 1.125 µL de paraformaldehído 4% (p/v) durante 24 h a 4° C y fueron luego centrifugadas (13.000 x g, 5 min), lavadas dos veces con PBS (0,1 M, pH 7,0), resuspendidas en 300 µL de etanol: PBS-99% (1:1 v/v) y almacenados a -20 °C durante al menos 1 h. La suspensión celular fue diluida y 20 µL de cada muestra se añadieron a cada pocillo de un portaobjetos de 6 pocillos (Tekdon Inc., Myakka City, FL). Los portaobjetos se secaron durante 15 min y se deshidrataron en etanol (50%, 80% y 96% (v/v)) durante 3 min. Para aumentar la permeabilidad celular de las sondas de Lab 158, Bif 164 y Ato 291, las muestras fueron tratadas con 50 µL de solución de lisozima (1 mg/mL en 100 mM Trizma HCl pH 8,0) a temperatura ambiente durante 15 min antes de ser lavadas con agua y deshidratadas en la serie de etanol.

La mezcla de hibridación (50 ng/mL de sonda en tampón de hibridación) fue añadida a la superficie de cada pocillo y se colocaron los portaobjetos en el horno de hibridación durante 4 h a la temperatura adecuada para cada sonda. Una vez finalizada la hibridación, los portaobjetos fueron lavados durante 15 min en 50 mL de tampón de lavado que contenía 20 µL de diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 50 ng/mL). A continuación, se lavaron con agua, se secaron con aire comprimido y se añadió una solución de fijación-tinción (alcohol polivinílico con colorante nuclear DABCO) a cada pocillo. Se mantuvieron en la oscuridad a 4 °C hasta su análisis.

Finalmente, se examinaron las células marcadas con DAPI bajo luz ultravioleta y se contaron las células hibridadas con un filtro de DM510. Cada pocillo se contó 15 veces

de forma aleatoria. Para realizar el cálculo del número de bacterias se utilizó la siguiente ecuación: $\log_{10} (C = N \times 0,8 \times 8702,47 \times 50q)$, donde C son las células/mL de la muestra, N es el número promedio derivado de 15 recuentos, 0,8 es el factor de dilución en la preparación de FISH, 8702,47 es la constante de ampliación, 50 se utiliza para la alícuota de 20 μL tomada de 1 mL y q es el factor de dilución. Los recuentos microbianos se expresaron como \log_{10} células bacterianas por mL de heces (**Artículo 4**).

4.4 ENSAYOS CON CULTIVOS CELULARES

Tanto los macrófagos como las células endoteliales han sido elegidas en diversos experimentos como modelos celulares por su implicación en la patogénesis de la aterosclerosis.

4.4.1 MONOCITO-MACRÓFAGO DE RATÓN (RAW 264.7)

Las células se sembraron en recipientes de cultivo de 75 cm^2 con 15 mL de Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa y L-glutamina suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (5000 U/mL) y se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 °C con un 5% CO_2 hasta alcanzar el 70-80% de su confluencia. Alcanzada la confluencia óptima, las células fueron desprendidas usando tripsina-EDTA y sub-cultivadas en otros recipientes de 75 cm^2 o en placas con pocillos para los ensayos.

Para la realización de los ensayos de **determinación de NO y TNF- α** , las células se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad de 2×10^5 en 2 mL de medio y en placas de 24 pocillos con una densidad de 5×10^4 en 0,5 mL de medio para **medir la citotoxicidad**. Tras 72 h las células alcanzaron el 80% de confluencia. Las células cultivadas en platos de 6 pocillos fueron tratadas con los ácidos gálico, vanílico, protocatéquico y siríngico en un rango de entre 0,01 y 500 μM en 4 tratamientos diferentes:

- a) Células pretratadas con los ácidos durante 3 h, lavadas con PBS y estimuladas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS durante 24 h.
- b) Células pretratadas con los ácidos durante 3 h, lavadas con PBS y estimuladas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS + 1000 U/mL IFN- γ durante 24 h.

- c) Células coincubadas con los ácidos junto con 1 µg/mL LPS durante 24 h.
- d) Células coincubadas con los ácidos junto con 1 µg/mL LPS + 1000 U/mL IFN-γ durante 24 h.

Además se usaron controles con las mismas condiciones sin los ácidos.

Para los **ensayos de citotoxicidad** las células fueron tratadas con los ácidos a las diferentes concentraciones durante 24 h (**Artículo 3**).

4.4.2 CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS (EA.hy 926)

Esta línea celular ha sido inmortalizada de células endoteliales de vena umbilical (HUEVEC) con la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549.

Las células fueron cultivadas en las mismas condiciones que los macrófagos. Una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia en placas de 24 pocillos fueron tratadas con los ácidos gálico, vanílico, protocatéquico y siríngico en un rango de concentraciones de 0 a 100 µM durante 24 h para **determinar su citotoxicidad**. Las células sembradas en platos de 6 pocillos fueron pretratadas con los ácidos (0, 1, 10, 50 y 100 µM) durante 16 h, seguidamente se realizó una estimulación con 10 ng/mL de TNF-α durante 6 h para **determinar la cantidad de MCP-1, ICAM-1 y VCAM-1** en el medio (**Artículo 3**).

4.4.3 VIABILIDAD CELULAR POR EL MÉTODO ROJO NEUTRO

El método ha sido utilizado para comprobar la citotoxicidad de los compuestos tanto en los macrófagos como en las células endoteliales. Este método está basado en la capacidad de las células viables para incorporar y unirse al colorante rojo neutro. Transcurrido el tiempo de incubación con los compuestos, se reemplazó el medio por una solución de rojo neutro de 50 µg/mL. Después de 2 h se añadió una solución de extracción (1% ácido acético, 49% H₂O y 50% etanol) y se dejó actuar 15 min. Por último se midió la absorbancia a 593 nm, refiriendo los datos respecto al 100% de viabilidad de las células no tratadas (control) (**Artículo 3**).

4.4.4 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO

El sobrenadante de los macrófagos tratados con los ácidos ha sido utilizado para medir la cantidad de nitrito (NO₂⁻) existente mediante la reacción de Griess²⁰⁸. Esta es una técnica espectrofotométrica en la que el NO reacciona con el oxígeno originando

dos productos estables y no volátiles: nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-); así el NO es medido indirectamente con estos compuestos. Durante la reacción, el nitrito en el medio ácido reacciona con sulfanilamida y forma la sal de diazonio. A continuación, esta sal se une a N-(1-naftil)etilendiamina formando un compuesto de color púrpura que presenta un máximo de absorción a 548 nm, pudiéndose cuantificar por espectrofotometría.

El sobrenadante se desproteinizó (250 μL de NaOH 0,3 M y 250 μL de ZnSO_4 0,3 M), se agitó y centrifugó (9.300 x g / 5 min). A cada muestra se le añadió un volumen igual de reactivo de Griess (1% sulfanilamida/0,1% N-(1-naftil)-etilendiamida dihidrocloruro/5% H_3PO_4) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en ausencia de luz. La concentración de nitrito se determinó midiendo la absorbancia a 540 nm en un lector de placas, refiriendo los resultados de absorbancia a una curva de calibración realizada con nitrito sódico en un rango de concentraciones entre 3,1 y 100 μM (**Artículo 3**).

4.4.5 DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE TNF- α

La secreción de TNF- α se midió en el sobrenadante de macrófagos mediante la técnica de sándwich ELISA. En el ensayo, el sobrenadante recogido fue centrifugado a 15.700 x g durante 10 min y guardado a -80 °C hasta su análisis el cual se realizó usando un kit comercial ELISA (Mouse TNF- α immunoassay, eBioscience). Las absorbancias obtenidas se refirieron a una curva de calibrado con un estándar de TNF- α a concentraciones comprendidas entre 18,7 y 1000 pg/mL (**Artículo 3**).

4.4.6 DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMIOTÁCTICA DE MONOCITOS-1 (MCP-1) Y LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR (ICAM-1 y VCAM-1)

La cuantificación de MCP-1, ICAM-1 y VCAM-1 en los sobrenadantes de las células endoteliales activadas con TNF- α y pretratadas con los ácidos fenólicos, se realizó a través de la técnica de sándwich ELISA usando un kit comercial ELISA (Diacclone, Bionova Scientific). Previamente el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 15.700 x g durante 10 min (**Artículo 3**).

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En general, los resultados se obtuvieron como la media \pm la desviación estándar (SD) de tres medidas independientes. Por un lado, el análisis estadístico fue realizado mediante el programa informático Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Inc., Rockville, MD, USA) utilizando el análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias obtenidas en la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiadhesiva, anti/estrogénica e inhibitoria de la ECA. La mínima diferencia significativa (LSD) mostró los valores estadísticamente diferentes con un nivel de significación de $p \leq 0,05$. Por otro lado, el análisis fue realizado mediante el programa informático de análisis de datos SPSS, versión 19.0 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA) realizando un análisis de la varianza (ANOVA): post hoc de comparaciones múltiples entre el número \log_{10} de bacterias de la muestra control y el resto de muestras analizadas. Las diferencias significativas fueron determinadas según el test de Turkey con un nivel de significación de $p \leq 0,05$.

TRABAJO
EXPERIMENTAL

ARTÍCULO 1

**“BIOCONVERSION OF ANTHOCYANINS GLYCOSIDES BY
BIFIDOBACTERIA AND LACTOBACILLUS”**

Food Research International (42, (2009) 1453-1461)



Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*

Marta Ávila, María Hidalgo, Concepción Sánchez-Moreno, Carmen Pelaez, Teresa Requena, Sonia de Pascual-Teresa *

Instituto del Frío (CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2009

Accepted 26 July 2009

Keywords:

Bifidobacterium
Lactobacillus
 β -glucosidase activity
Anthocyanins
Malvidin
Delphinidin
Phenolic acids

ABSTRACT

Eight strains of *Lactobacillus plantarum*, 6 strains of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, and *Bifidobacterium lactis* BB-12 were screened for β -glucosidase activity. We then proceeded to investigate the enzymatic potential of selected strains for bioconversion of delphinidin and malvidin glycosides to their metabolites. *L. plantarum* and *L. casei* strains showed the highest cell-envelope associated β -glucosidase activity. Intracellular β -glucosidase activity from *B. lactis* BB-12 was up to 287-fold higher than that of the other strains. The *L. acidophilus* strain showed low β -glucosidase activity, both, intra and extracellularly. No aglycons were detected in bacterial extract reactions with anthocyanin glycosides. Delphinidin-3-glucoside underwent chemical degradation to form mainly gallic acid, although delphinidin-3-glucoside degradation due to *B. lactis* BB-12 and enzymatic activity towards chemically-formed metabolites due to *L. casei* LC-01 were observed. Incubation of malvidin-3-glucoside with *B. lactis* BB-12, *L. plantarum* IFPL722, and *L. casei* LC-01 cell-free extracts led to different patterns of gallic, homogentisic and syringic acid formation.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Development of functional food products is one of the major trends within food science and technology. Recent research has been centred on the more specific health benefits offered by food ingredients from plants, namely sterols, carotenoids and polyphenols, and in the latter case, the focus has been on anthocyanins. Anthocyanins are natural pigments belonging to the flavonoid family and are responsible for the red–blue color of many fruits and vegetables. They are polyhydroxy or polymethoxy derivatives of 2-phenyl-benzopyrylium and most of them are present in plants attached to sugars as mono, di or triglycosides, by α - or β - linkage, most frequently at C-3 of the aglycons (anthocyanidins). The most common sugar moieties are glucose, galactose, rhamnose, arabinose and xylose. As with other flavonoids, the potent antioxidant properties of anthocyanins as free radical scavengers in *in vitro* models are often assumed to play a role in their bioactivity (García-Alonso et al., 2005). Experimental data indicate that dietary anthocyanins may protect against cardiovascular disease (García-Alonso, Minihane, Rimbach, Rivas-Gonzalo, & de Pascual-Teresa, 2009 and García-Alonso, Rimbach, Rivas-Gonzalo, & de Pascual-Teresa, 2004). Moreover, anthocyanins are also interesting from a technological point of view, as natural colorants or

antioxidants, and are used as food additives in beverages, fruit fillings, snacks and dairy products.

The effectiveness of anthocyanins in preventing or treating a range of diseases depends on their bioavailability but, as recently reviewed by Manach, Williamson, Morand, Scalbert, and Rémésy (2005), this group of pigments is less well absorbed from the gastrointestinal tract than other flavonoids. Some of the ingested flavonoids can be directly absorbed as glycosides through the epithelium sugar transporters or hydrolysed by intestinal mucosal enzymes and absorbed passively, to then undergo conjugation in the ileal epithelium or in the liver (Aura, 2008). Hepatic phenolic metabolites are returned to the colon via bile, where those flavonoids still bound to the food matrix or that could not be absorbed also arrive. Colonic bacteria degrade the non-digested food matrix and transform phenolic components into bacterial metabolites. The nature and position of the glycosidic groups in the molecules and the structure of anthocyanidins may influence their absorption (Matsumoto, Inabam, Kishi, Tominaga, Hirayama, & Tsuda, 2001; McGhie, Ainge, Barnett, Cooney, & Jensen, 2003; Nielsen, Dragsted, Ravn-Haren, Freese, & Rasmussen, 2003). Furthermore, the biological activity of anthocyanins can also be affected by glycosylation, which renders the molecule more water-soluble but less reactive towards free radicals and metals, diminishing their antioxidant activity (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997). Therefore, bacteria possessing an enzymatic system able to metabolize anthocyanins may play a major role in the production of compounds with a different bioavailability and biological activity.

* Corresponding author.

E-mail address: soniapt@if.csic.es (S. de Pascual-Teresa).

Intestinal bacteria are known to be equipped with a vast array of enzymes capable of hydrolysing various flavonoid glycosides (Winter, Moore, Dowell, & Bokkenheuser, 1989). Deglycosylation, ring fission, reductive metabolism of phenyl acyl fragments, aromatic hydroxylation and dehydroxylation, reducing carbon–carbon double bonds as well as the lengthening and shortening of the aliphatic C chain can be carried out by intestinal microorganisms on flavonoid compounds (Lee, Jenner, Low, & Lee, 2006; Rice-Evans et al., 1997). Hydrolysis of anthocyanin glycosides is proposed as the first step for subsequent bacterial degradation and the formation of a set of new metabolites, that have not yet been totally identified, which may be involved in both body systemic and local protective actions. *In vitro* studies have shown that anthocyanin monoglucosides and diglucosides are de-glycosylated by the action of colonic microflora in a 20 min to 2 h period, depending on their structure (Aura et al. 2005; Keppler & Humpf, 2005). Aglycons appear transiently, and are further degraded mainly to the phenolic acid corresponding to anthocyanidin ring-B, appearing in some cases after 20 min of incubation with intestinal microflora (Aura et al. 2005; Fleschhut, Kratzer, Rechkemmer, & Kulling, 2006; Keppler & Humpf, 2005).

Bifidobacteria spp. and *Lactobacillus* spp. are predominant members of the intestinal microflora and some strains have been characterized as probiotics. It has been shown that species of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* possess β -glucosidase activity and participate in the hydrolysis of plant β -glycosides (Winter et al., 1989; Choi, Woo, & Noh, 1999; Jeon, Ji, & Hwang, 2002; Matsuda, Norimoto, Matsumoto, Ohba, Teramoto, & Ohta, 1994; Otieno, Ashton, & Shah, 2005), but little is known about their potential for bio-transformation of anthocyanins.

The objectives of this study were to screen *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* strains for β -glucosidase activity, and to investigate their enzymatic potential for converting delphinidin and malvidin glycosides, two of the anthocyanidin most commonly found in foods, into other compounds with different bioavailability and bioactivity.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Malvidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Syringic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid), gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), **homogentisic acid** (2,5-dihydroxyphenylacetic acid), sinapic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid), *p*-coumaric acid (*trans*-4-hydroxycinnamic acid), DMB propionic acid (3-2',5'-dimethoxybenzoylpropionic acid) and *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside were provided by Sigma–Aldrich (Stenheim, Germany). General names are used to refer to the phenolic degradation products. HPLC-grade solvents were used and were obtained from Pancreac Química SA (Barcelona, Spain).

2.2. Bacterial strains and growth conditions

Lactobacillus acidophilus LA-5, *Lactobacillus casei* LC-01, and *Bifidobacterium lactis* BB-12 strains had been previously isolated from a commercial synbiotic product (Simbiotic Drink; Priégola, Madrid, Spain) in our laboratory. The *Lactobacillus plantarum* strains (IFPL710, IFPL711, IFPL714, IFPL715, IFPL722, IFPL724, IFPL726 and IFPL935) and the *L. casei* strains (IFPL99, IFPL727, IFPL731, IFPL7160 and IFPL7190) were taken from the IF culture collection where they had originally been produced from cheese. Cultures were maintained at -80°C in MRS broth (Pronadisa, Madrid,

Spain) supplemented with glycerol (40% v/v) and subcultured in MRS broth before use in experiments.

For experiments, strains were grown with a 1% inoculation into MRS fermentation broth (Pronadisa, Barcelona, Spain), which does not contain either glucose or meat extract (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960), supplemented with 0.5% lactose, 0.2% Tween 80, 0.8% casein acid hydrolysate and 0.05% cysteine. *L. acidophilus* and *B. lactis* were incubated under anaerobic conditions (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid Ltd., Hampshire, England) for 18 h at 37°C . *L. casei* and *L. plantarum* strains were incubated aerobically for 18 h at 30°C .

2.3. Obtaining bacteria whole-cell concentrates and cell-free extracts

All strains were screened for cell-envelope associated (whole-cell concentrates) or intracellular (cell-free extracts) β -glucosidase activity. Bacteria were grown under optimal conditions; and then cells were harvested by centrifugation ($10,000\times g$, 15 min, 4°C) and washed twice with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5. To obtain the whole-cell concentrates, harvested cells from the different cultures were resuspended in the same buffer to an $\text{OD}_{600} \sim 0.5$ and immediately tested for β -glucosidase activity. To obtain the cell-free extracts, harvested cells were frozen at -80°C , resuspended in 500 μl buffer 50 mM sodium phosphate, pH 6.5, then mixed (1:1, w/v) with sterile glass beads (diameter, 150–212 μm ; Sigma) and beaten for mechanical disruption in a FastPrep equipment (Bio101 Savant Instruments). The insoluble fraction and glass beads were removed by centrifugation ($12,000\times g$, 10 min, 4°C) and the supernatant fraction stored at -80°C until use. Protein content of the cell-free extracts was determined using the Bradford method (Bradford, 1976) employing the Bio-Rad (Bio-Rad, Munich, Germany) protein assay and BSA for preparation of standard curve.

2.4. β -Glucosidase activity assay

β -Glucosidase activity was measured on duplicate samples with *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as substrate. Standard β -glucosidase reactions were performed mixing 450 μl of 1 mM *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside prepared in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, with 50 μl of whole-cell concentrate or cell-free extract and incubated at 40°C . The reactions were stopped on ice by adding 500 μl of NaOH 0.1 M. The amount of *p*-nitrophenol released was measured at 410 nm spectrophotometrically. One unit of enzyme activity was defined as the amount of β -glucosidase that released 1 μmol of *p*-nitrophenol from the substrate per min. For experiments with cell-free extracts, activity was expressed as units of enzyme per mg of protein.

2.5. The effect of chemical stability and bacterial activity on anthocyanin glycosides

L. acidophilus LA-5, *L. casei* LC-01, *B. lactis* BB-12 and *L. plantarum* IFPL722 were chosen to study the effect of their bioactivity on anthocyanins. Malvidin and delphinidin glycosides were prepared as individual stock solutions in DMSO at 10 mM, aliquoted and kept at -80°C between analyses. Chemical degradation of anthocyanins was determined by mixing 5 μl of stock malvidin or delphinidin glycosides with 495 μl of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, in control samples. Bacterial activity towards anthocyanins was carried out in duplicate by mixing 5 μl of stock malvidin or delphinidin glycosides and 50 μl of appropriately diluted whole-cell concentrates ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} \sim 0.5$) or cell-free extracts (with the same protein concentration) in 445 μl of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5. The final DMSO concentration in the reactions did not affect bacterial activity. Samples were incubated at 37°C

for up to 24 h in the dark, and 100 µl aliquots were taken after 30 min, 2 h and 24 h of incubation with whole-cell concentrates and after 1 h, 5 h and 24 h of incubation with the cell-free extracts. Reactions were stopped on ice by adding 100 µl of methanol containing 0.1% HCl, and the remaining cells were removed by centrifugation (10,000×g, 10 min, 4 °C). Samples were stored at –20 °C until chromatographic analysis. Negative controls were prepared as the standard reaction without anthocyanins.

2.6. Analysis and identification of the anthocyanins and their metabolites

Analysis of the disappearance of anthocyanin glycosides and the formation of anthocyanin metabolites was carried out using a Hewlett–Packard Agilent 1100 Series liquid chromatograph with a quaternary pump and a photodiode array detector. Samples were filtered through a 0.45 µm filter and injected into the HPLC system. The HPLC system was equipped with a Phenomenex Luna C18 column (5 µm; 200 Å; 4.6 × 150 mm) which was set thermostatically at 25° C. Solvents used were aqueous 4.5% formic acid (A) and HPLC-grade acetonitrile (B) at a flow rate of 0.5 mL/min. Starting with 10% B, the gradient was 20% B from 0 to 20 min, 25% B from 20 to 30 min, 35% B from 30 to 40 min and from 40 to 50 min 35% B. Detection wavelengths were 280, 320, 440 and 520 nm and samples were analysed in triplicate. Anthocyanins were detected at 520 nm and their peak areas were referred to calibration curves obtained with malvidin-3-glucoside or delphinidin-3-glucoside. Areas of identified phenolic acids were compared with calibration curves prepared with the corresponding standard acids, wherever possible.

In order to confirm the identity of the recorded anthocyanins and phenolic acids, additional analyses were performed by using HPLC with mass spectrometry detection. HPLC conditions were as in de Pascual-Teresa, Santos-Buelga, and Rivas-Gonzalo (2000). For mass spectrometry a Finnigan LCQ (Thermoquest, San José, CA, USA) equipped with an API source and employing an ESI (electrospray ionisation) interface was used. Sheath as well as auxiliary gas was a mixture of helium and nitrogen. The capillary voltage was 3 V and the capillary temperature 180 °C. A full scan from m/z 120 to 1500 and in addition MS² and MS³ spectra from the most abundant ion were recorded.

2.7. Statistical analysis

All the analyses were performed in triplicate and results are presented as mean ± standard deviations of three independent incubations.

3. Results and discussion

3.1. Screening of bacteria for β-glucosidase activity

Since the investigated anthocyanins present a β-glucosidic bond in their structure, we screened 16 strains for cell-envelope or intracellular associated β-glucosidase activity using *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside. All tested strains were positive for this activity, and results of representative strains are presented in Table 1. *L. plantarum*, and *L. casei* strains showed the highest cell-envelope associated β-glucosidase activity, which was up to 25–27 times higher than *L. acidophilus* LA-5 in the case of *L. plantarum* IFPL722 and IFPL711 strains. Intracellular β-glucosidase activity of *L. plantarum* and *L. casei* strains was quite low. In results similar to ours, *L. plantarum* KFRI 00144 showed the highest cell-envelope associated β-glucosidase activity when compared with other different lactobacilli and bifidobacteria strains (Pyo, Lee, & Lee, 2005). Unlike lac-

Table 1

β-glucosidase activity of selected strains in whole-cell concentrates and cell-free extracts.

Strains	Cell-envelope associated activity ^a	Intracellular activity ^b
<i>L. plantarum</i>		
IFPL711	2.18	0.09
IFPL715	1.20	0.07
IFPL722	1.98	0.12
IFPL724	0.93	0.13
IFPL935	1.41	0.09
<i>L. casei</i>		
IFPL7190	0.97	0.07
LC-01	0.57	0.13
<i>L. acidophilus</i> LA-5		
	0.08	0.30
<i>B. lactis</i> BB-12		
	0.21	20.10

^a One unit of enzyme activity was defined as the amount of β-glucosidase that released 1 µmol of *p*-nitrophenol from the substrate per min.

^b Activity was expressed as units of enzyme per mg of protein.

tobacilli strains in general, the intracellular activity of *B. lactis* BB-12 stands out, being up to 287-fold higher than that of the other strains. Tsangalis, Ashton, McGill, and Shah (2002) observed that the level of *Bifidobacterium* β-glucosidase activity varies significantly depending on the carbon source of the growth medium. When *B. animalis* was grown in MRS-lactose or MRS-raffinose they found that it was the highest producer of intracellular β-glucosidase compared with *B. pseudolongum*, *B. longum* and *B. infantis*. *L. acidophilus* LA-5 showed low activity either in the whole-cell concentrates or in the cell-free extracts. Otieno et al. (2005) reported the highest β-glucosidase activity after 24 h of incubation in soy-milk for *L. casei* strains, followed by *L. acidophilus* strains, whereas *Bifidobacterium* strains showed the least activity.

Due to differences in the ability of the tested strains to cleave to the β-glucosidic bond of *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, one strain of each species (*L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01, *B. lactis* BB-12 and *L. plantarum* IFPL722) was chosen for further characterisation against the malvidin and delphinidin glycosides.

3.2. Identification of anthocyanin glycosides and their metabolites

New peaks that could have resulted from anthocyanin degradation due to chemical or bacterial enzymatic degradation were traced by HPLC-PDA chromatographic analysis, the samples being incubated with or without bacterial cell-free extracts. Whenever possible, observed anthocyanin metabolites were identified on the basis of chromatographic and spectral characteristics and quantified using standard curves of the corresponding phenolic acid (Table 2).

Fig. 1A shows the HPLC chromatogram recorded at 280 nm of malvidin-3-glucoside incubated with *L. plantarum* IFPL722 for 24 h, with similar detected peaks for the other strains. Gallic acid (peak 1), homogentisic acid (peak 2), syringic acid (peak 3), *p*-coumaric acid (peak 4) and sinapic acid (peak 5) were identified by their retention times and spectra and by comparison with standards. DMB propionic acid was also detected at 320 nm and identified in the same way, in the 24 h sample of malvidin-3-glucoside incubated with an *L. casei* LC-01 sample. Additionally, another peak (peak 7, chromatogram 1B) was detected in the HPLC profile at 320 nm of malvidin-3-glucoside incubated with *B. lactis* BB-12. Peak 7 presented UV-Vis spectra with two absorption maximums at 324 and 362 nm and its analysis by HPLC-MS produced a mass spectrum showing a major signal at m/z 345. The fragment ions originated in the MS² analysis gave rise to signals in the spectrum at m/z's 317 and 153. However, further identification of this peak could not be achieved.

Table 2
Chromatographic and spectral characteristics of possible anthocyanin metabolites produced by cell-free extracts of *L. plantarum* IFPL722, *L. casei* LC-01, *B. lactis* BB-12 and *L. acidophilus* LA-5.

Peak	Name	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Molecular ion M^+ (amu)	Fragment ions in MS^2 (amu)
1	Gallic acid	4.7	274	171	
2	Homogentisic acid	5.9	292	169	
3	Syringic acid	14.0	274	199	
4	<i>p</i> -Coumaric acid	19.3	310, 298	165	
5	Sinapic acid	22.1	322	225	
6	DMB propionic acid	39.0	334	239	
7	Unknown	33.0	324, 362	345	317, 153

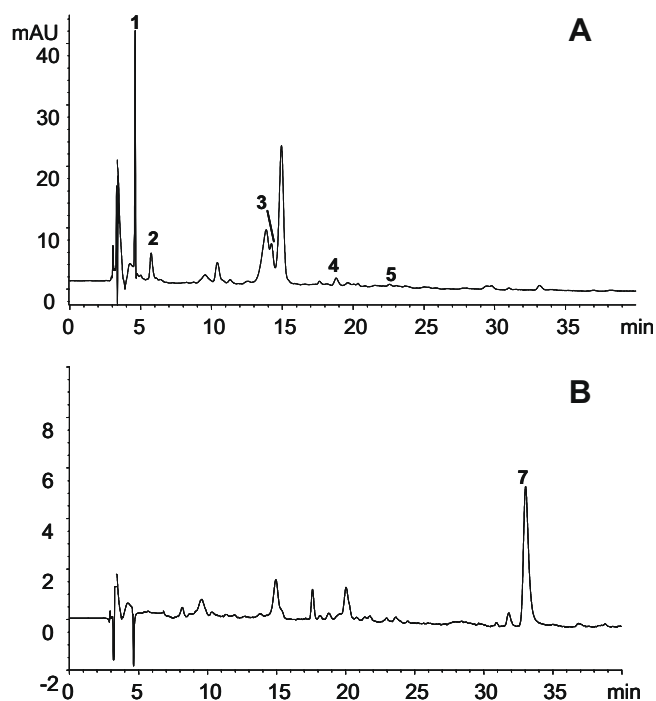


Fig. 1. HPLC chromatograms recorded at 280 nm corresponding to malvidin-3-glucoside incubated with *L. plantarum* IFPL722 cell-free extract, at 24 h (A) and at 320 nm corresponding to malvidin-3-glucoside incubated with *B. lactis* BB-12 cell-free extract, at 24 h (B). Peak identities are detailed in Table 2.

3.3. Chemical and bacterial degradation of anthocyanin glycosides

Analysis of anthocyanin glycoside controls (reactions without bacteria whole-cell concentrates or cell-free extracts) at 0 h showed that sample treatment affected the extraction yield of both anthocyanin glycosides in a similar way. From their initial concentration of 100 μM , around 80% was recovered, or more precisely, $79.3 \pm 5.3 \mu\text{M}$ in the case of malvidin-3-glucoside and $84.4 \pm 19.9 \mu\text{M}$ in the case of delphinidin-3-glucoside.

Unexpectedly, degradation of malvidin and delphinidin glycosides in the presence of the whole-cell concentrates was only observed after 24 h of incubation but not for all the strains (Fig. 2). A significant decrease in malvidin-3-glucoside levels after a 24 h incubation period was only shown in the case of the *L. plantarum* IFPL722 whole-cell concentrate, giving rise to an HPLC profile similar to the one shown in Fig. 1, but with very little gallic acid present. However, this belated disappearance of anthocyanins and the appearance of phenolic acids cannot be attributed with certainty to the activity of intact cells because lysis and release of their intracellular enzymes may have occurred after such a time. Therefore, we decided to carry out the remaining analyses only with the cell-free extracts of the four selected strains.

Neither delphinidin nor malvidin aglycones could be detected under any of the assayed incubation conditions. As they had most probably been formed transitorily, their detection was not possible (Fig. 3) since aglycones are quite unstable in neutral media, where the reactive carbinol or pseudobase may be transformed into its corresponding chalcone which later undergoes a rapid ring fission producing the corresponding phenolic acid and phloroglucinol aldehyde (Piffaut, Kader, Girardin, & Metche, 1994). In accordance with this latter hypothesis we found the chalcone of malvidin-3-glucoside in most of the analysed samples at a retention time of 9.9 min. However, the relative quantity of the peak remained constant in all the incubations and at all time points, corresponding in every case to 0.9–1.4% of the total amount of malvidin-3-glucoside detected in the sample. Moreover, anthocyanidins may have suffered subsequent bacterial enzymatic degradation after their formation. In this sense, malvidin aglycon has been shown to disappear almost completely after 60 min of incubation in phosphate buffer, pH 7.4, at 37 °C (Fleschhut et al., 2006), only being detectable in small amounts $<10 \mu\text{M}$ after a 2 h incubation with pig gut microflora (Keppler & Humpf, 2005). Most probably because of the high reactivity of aldehydes, phloroglucinol aldehyde was not detected either; condensation with free NH_2 -groups of amino acids or proteins and the formation of imine may have occurred (Keppler & Humpf, 2005).

3.4. Chemical stability and bacterial activity on delphinidin-3-glucoside

HPLC chromatograms of the control sample (reaction without whole-cell concentrates or bacteria cell-free extracts) revealed that delphinidin-3-glucoside underwent chemical degradation during incubation at pH 6.5 and 37 °C. Around 60% of it disappeared within the first 5 h, and was almost completely degraded by 24 h (Fig. 4A). Chemical stability is affected by pH, temperature, light, oxygen, and anthocyanin structure (Jackman & Smith, 1996). Although the presence of a glucoside molecule confers stability to anthocyanins, preventing the degradation of the highly unstable α -diketone intermediates to the phenolic acid and aldehyde, the degradation rate of anthocyanins increases as temperature, pH and the number of hydroxyl groups rises. The presence of 3 hydroxyl groups in the B-ring of the delphinidin structure makes it quite susceptible to chemical degradation under adverse environmental conditions, as our results suggest. Chemical breakdown of delphinidin leads mainly to gallic acid formation, the major stable phenolic acid derived from ring fission of the delphinidin skeleton (Fig. 4B). As expected, concentrations of this phenolic acid were detected at 1 h in samples, which increased throughout the time period concomitantly with delphinidin-3-glucoside disappearance. Traces ($<0.4 \mu\text{M}$) of homogentisic and syringic acids (Fig. 4B) and *p*-coumaric acid were also detected in control sample from 5 h on.

Bacterial degradation of delphinidin-3-glucoside due to *B. lactis* BB-12 intracellular activity was observed in addition to chemical degradation. Residual delphinidin-3-glucoside in *B. lactis* BB-12

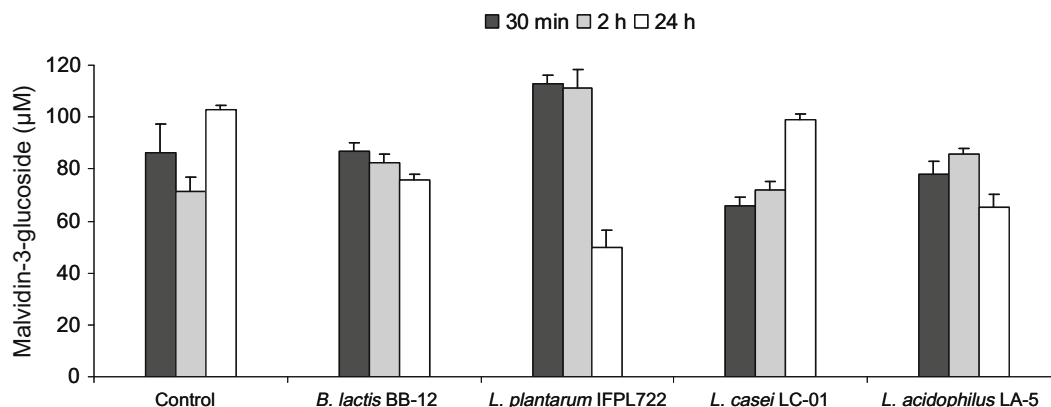


Fig. 2. Malvidin-3-glucoside degradation in control sample (without bacteria whole-cell concentrates) and after incubation with whole-cell concentrates from *B. lactis* BB-12, *L. plantarum* IFPL722, *L. casei* LC-01 and *L. acidophilus* LA-5 strains.

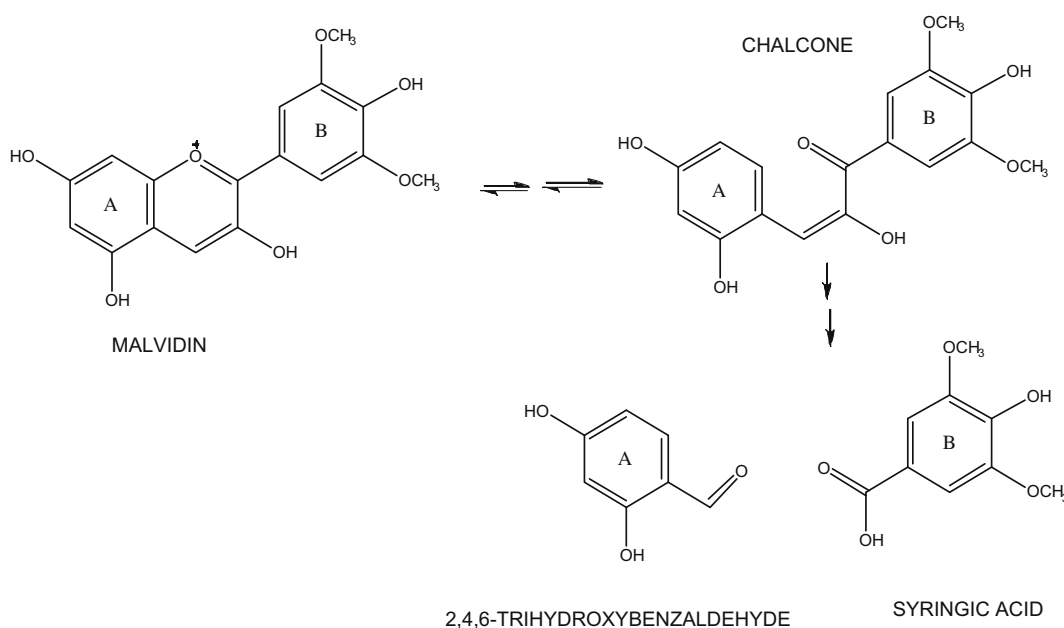


Fig. 3. Degradation of anthocyanins and formation of aldehyde and phenolic acid.

samples was 83.9% and 49.9% of that of the control sample (without bacterial extract), at 1 h and 5 h, respectively (Fig. 4A). As previously stated, dramatically high intracellular β -glucosidase activity for *B. lactis* BB-12 strain was detected (Table 1) which may have been translated into a higher deglycosylation of delphinidin-3-glucoside. As delphinidin aglycon is highly sensitive to subsequent degradation, an increase in gallic acid concentrations, 3.4- and 1.3-fold that of the control sample, was observed at 1 h and 5 h, respectively (Fig. 4B). It was not possible to distinguish if chemical or enzymatic C-ring fission of delphinidin aglycon occurred due to the high rate of chemical degradation. Concentrations similar to those of the control sample were found for the rest of the phenolic acids. Furthermore, formation of sinapic acid was also recorded in some 24 h samples of *B. lactis* BB-12.

On the other hand, the *L. plantarum* IFPL722 cell-free extract might have produced a certain degree of protection against chemical degradation of delphinidin-3-glucoside. Delphinidin-3-glucoside concentrations were 1.4-fold and 4-fold higher in the presence of cell-free extracts from *L. plantarum* IFPL722, at 5 h and 24 h, respectively, than when these extracts were not present (Fig. 4A). Consistent with this, lower concentrations of phenolic

acids, mainly gallic acid, were registered than in the control sample (Fig. 4B). A possible explanation for this effect is that anthocyanins may interact with the protein present in the cell-free extracts, and somehow protect anthocyanins from degradation under the pH and temperature conditions of the experiments. Once acidified methanol is added to the incubation reaction to stop it, anthocyanins might be released once again from their linkage with proteins and consequently be quantified. The fact that this effect is only evident in the case of delphinidin-3-glucoside and not in the case of malvidin-3-glucoside may be explained by the differences in their substitution in ring-B. The presence of two methoxyl groups in the B-ring of malvidin produces an increase in its chemical stability and may also have a negative effect in terms of anthocyanin–protein interaction.

Apparently, *L. casei* LC-01 intracellular content did not seem to increase delphinidin-3-glucoside degradation (Fig. 4A). However, the highest concentrations of gallic, homogentisic and syringic acids were found in the presence of the *L. casei* LC-01 extract after 24 h of incubation, and were even higher than concentrations resulting from chemical degradation (Fig. 4B). Consequently, these increases should be a result of further *L. casei* LC-01 enzymatic

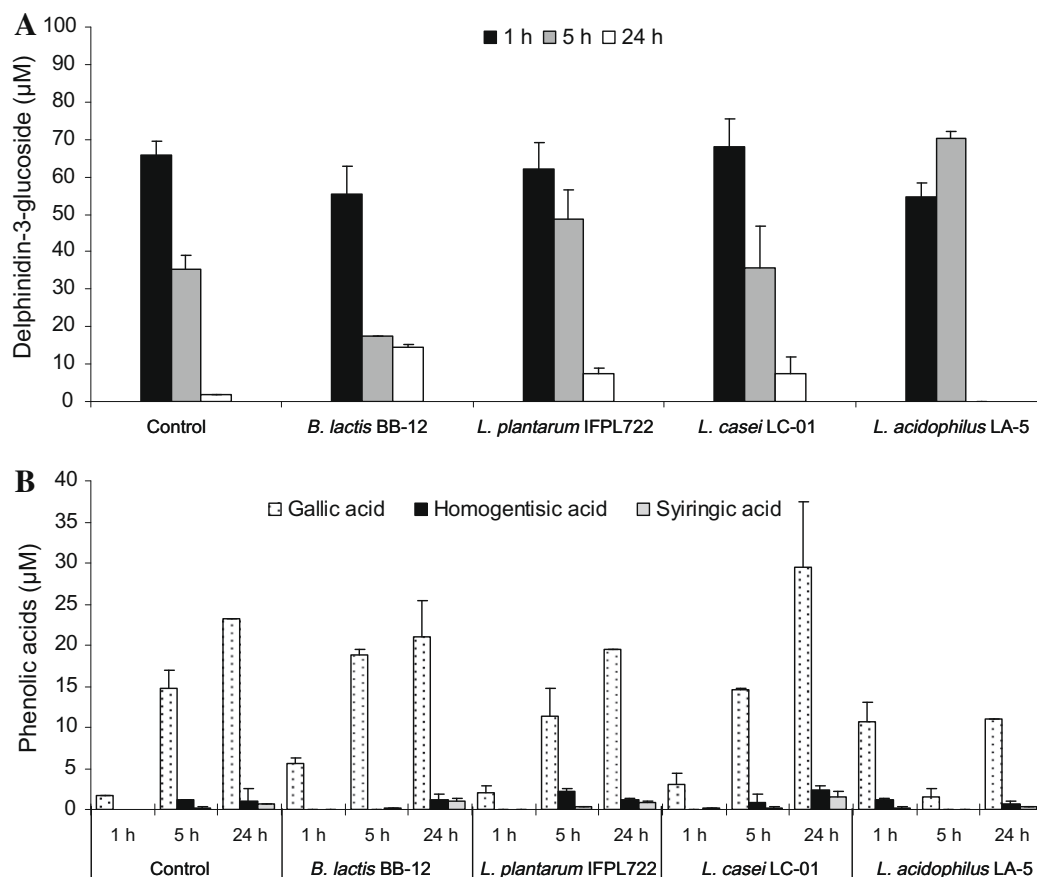


Fig. 4. Comparison of the disappearance of delphinidin-3-glucoside (A) and the formation of phenolic acids (B), in control sample (without bacteria cell-free extracts) and in the presence of cell-free extracts from *B. lactis* BB-12, *L. plantarum* IFPL722, *L. casei* LC-01 and *L. acidophilus* LA-5 strains.

activity towards metabolites formed from chemical degradation. Furthermore, formation of sinapic acid was also recorded in some 24 h samples of *L. casei* LC-01.

Erratic behaviour was observed for *L. acidophilus* LA-5. In the first hour of incubation, *L. acidophilus* LA-5 cell-free extract caused similar delphinidin-3-glucoside degradation as *B. lactis* BB-12, and showed 6.5-fold more gallic acid concentration and slightly higher homogentisic, syringic and *p*-coumaric acids than in the control sample (Fig. 4A and B). However, after 5 h delphinidin-3-glucoside concentration remained at a similar level as that after 1 h, completely disappearing by 24 h. Only traces of phenolic acids were detected after 5 h, but by 24 h gallic acid formation was observed again, although at a lower level than the control sample.

3.5. Chemical stability and bacterial activity on malvidin-3-glucoside

With respect to chemical degradation, malvidin-3-glucoside remained relatively stable at pH 6.5 and 37 °C, since its concentration remained constant throughout the incubation period (Fig. 5A). Therefore, syringic acid, the primary phenolic acid formed from the malvidin aglycon, was not detected in control samples, where only low concentrations of homogentisic acid (Fig. 5B) and traces of *p*-coumaric acid <0.1 M appeared. In general, methoxylation, glycosylation, and acylation lead to an increase in anthocyanin stability (Jackman & Smith, 1996). This could explain why malvidin, which is a highly methylated anthocyanin, remained stable under experimental conditions, unlike delphinidin glucoside.

Fig. 5A and B show the decreasing amounts of malvidin-3-glucoside and the increasing amounts of degradation metabolites in the experiments using bacteria cell-free extracts. Biological degra-

dation of malvidin-3-glucoside, between 8.1% and 15%, occurred during the first hour owing to *B. lactis* BB-12, *L. plantarum* IFPL722, and *L. casei* LC-01 cell-free extracts. The fastest rate of degradation was detected in the presence of the intracellular content of *L. casei* LC-01 (57.7% residual malvidin-3-glucoside), followed by *L. plantarum* IFPL722 (66.4% residual malvidin-3-glucoside) and *B. lactis* BB-12 (74.8% residual malvidin-3-glucoside), after 5 h. Unlike delphinidin-3-glucoside, the high intracellular β -glucosidase activity of *B. lactis* BB-12 (Table 1) did not correspond with a faster rate of disappearance of malvidin-3-glucoside from 1 h to 5 h. Simultaneous enzymatic reactions due to the variety of released intracellular enzymes may have taken place apart from deglycosylation in malvidin-3-glucoside degradation, *B. lactis* BB-12 enzymes being less effective than those of *L. casei* LC-01 and *L. plantarum* IFPL722.

B. lactis BB-12, *L. casei* LC-01 and *L. plantarum* IFPL722 cell-free extracts produced different patterns of metabolite formation from those of malvidin-3-glucoside throughout the time period (Fig. 5B). This would indicate that after enzymatic deglycosylation of the malvidin glucoside not only did no chemical breakdown take place, but bacterial enzymatic metabolism participated in the subsequent degradation of the aglycon. The cell-free extract of *B. lactis* BB-12 gave rise to the highest formation of gallic acid of all the strains, 12.7 μ M, after 5 h, even though substantial syringic acid was formed. Concentrations of both compounds had decreased by 24 h due to further enzymatic degradation (Fig. 5B). Appearance of a new peak at Rt 33 min, which could not be identified (Peak 7, Table 2), was also recorded in *B. lactis* BB-12 samples after a 5 h incubation period. Peak 7 concentrations increase with the incubation time. Low concentrations (<3 μ M) of homogentisic acid appeared from 5 h onwards, probably due to chemical degradation.

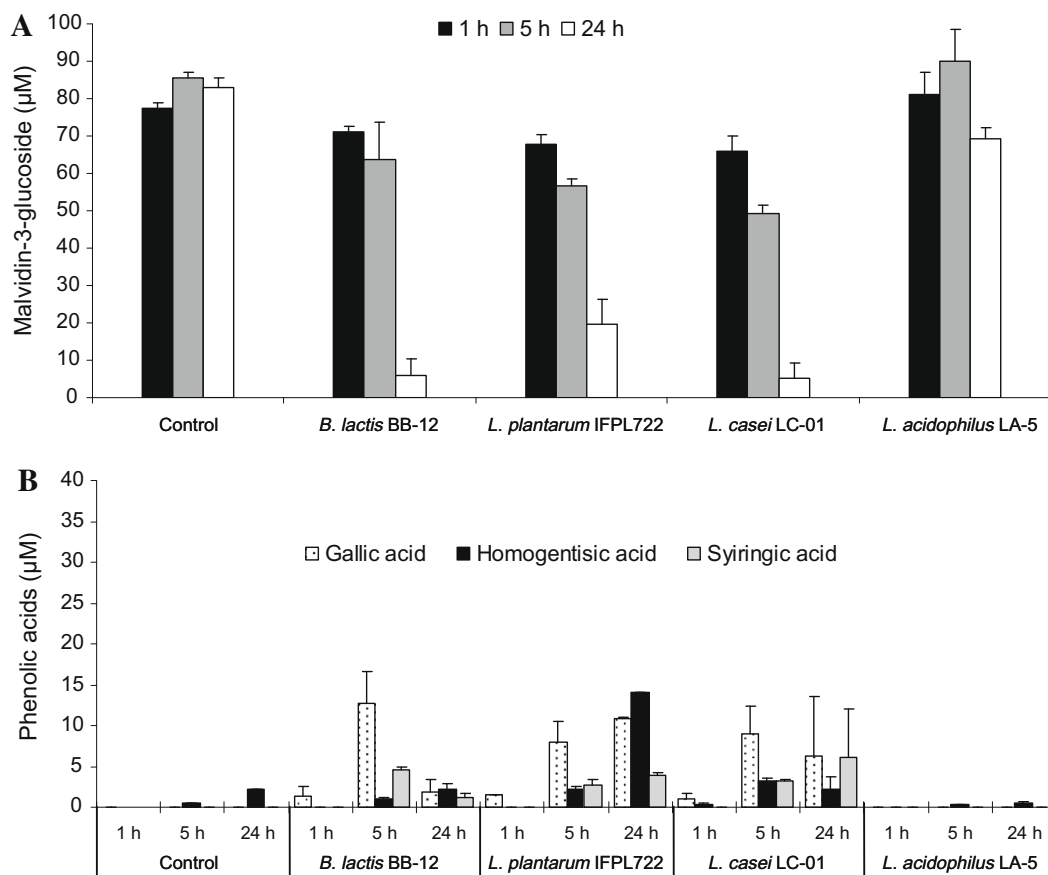


Fig. 5. Comparison of the disappearance of malvidin-3-glucoside (A) and the formation of phenolic acids (B), in control sample (without bacteria cell-free extracts) and in the presence of cell-free extracts from *B. lactis* BB-12, *L. plantarum* IFPL722, *L. casei* LC-01 and *L. acidophilus* LA-5 strains.

Homogentisic acid formation stands out in the case of *L. plantarum* IFPL722 extract incubation with malvidin-3-glucoside, reaching up to 14.1 µM by 24 h, the highest concentration for all bacteria and all detected phenolic acids. The *L. plantarum* strain extract also produced an important concentration of gallic acid, the formation of syringic acid, which increased throughout the time period (Fig. 5B), and sinapic acid which was also detected in some 24 h samples. On the other hand, the *L. casei* LC-01 cell-free extract led mainly to gallic and syringic acid formation. The maximum formation of gallic acid was measured after 5 h, subsequently followed by enzymatic degradation. Syringic acid increased over the time period to reach 6.2 µM after 24 h, the highest concentration of all strains (Fig. 5B). Furthermore, the *L. casei* LC-01 extract incubation produced substantial levels of homogentisic acid, and DMB propionic acid appeared in some of the 24 h chromatograms of this strain. Unlike the other tested bacteria, the cell-free extract of *L. acidophilus* LA-5 did not cause any or scarcely any degradation of malvidin-3-glucoside, and only the formation of peak 7 was recorded in 24 h samples (Fig. 5A and B). Thus, each of the above-mentioned bacteria contained enzymatic equipment capable of transforming to a greater or lesser degree malvidin-3-glucoside. As observed with delphinidin-3-glucoside, traces of *p*-coumaric acid (<0.3 µM) were found in samples of all strains.

It is generally accepted that the degradation of anthocyanin-3-glucosides into their corresponding phenolics acids seems to be a general pathway for these substances, either chemically or microbiologically. Syringic acid was identified as the major degradation product after incubation of human faecal (Fleischhut et al., 2006) or pig gut (Keppler & Humpf, 2005) microflora with malvidin-3-glucoside. However, the relative formation of metabolites by *B. lactis*

BB-12, *L. casei* LC-01 and *L. plantarum* IFPL722 cell-free extracts is different from those described by other authors. The enzymatic extracts of these strains led mainly to gallic and homogentisic acid formation, depending on the strain, even though syringic acid was also formed.

Our results suggest that after, or simultaneously with glucose release from malvidin-3-glucoside, reactions other than those of the breakdown pathway may be occurring due to the bacteria enzymatic pool. Deglycosylation, ring fission, reductive metabolism of phenyl acyl fragments, aromatic hydroxylation and dehydroxylation, reducing carbon-carbon double bonds as well as lengthening and shortening of the aliphatic C chain can be carried out by intestinal microorganisms on flavonoid compounds (Lee et al., 2006; Rice-Evans et al., 1997). Syringic acid might have suffered subsequent enzymatic demethylation of C3 and C5 of the B-ring, which degenerated into gallic acid. Absorption and antioxidative properties of phenolic acids in the intestine may be influenced by demethylation. Few studies have been carried out on bioavailability of hydroxybenzoic acids, but most of them showed that gallic acid is very well absorbed (Tomás-Barberán & Clifford, 2000). This acid has an antioxidant capacity of 3.0 mM TEAC, corresponding to the three available hydroxyl groups, while substitution of the 3- and 5-hydroxyl with methoxy groups in syringic acid (1.36 mM TEAC) and in the malvidin aglycon (2.0 mM TEAC) demonstrates a diminution in antioxidant activity compared to the trihydroxy derivative (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). *In vitro* studies of gallic acid have shown it to be cytotoxic against various cancer cell lines, induce apoptosis and have an antiproliferative effect *in vitro* (Tomás-Barberán & Clifford, 2000).

In general, the decrease in detectable anthocyanins did not correspond with the increase in the respective phenolic acids, indicating that additional factors might contribute to anthocyanin disappearance without degradation. At physiological pH values, the flavylium form of anthocyanins is reversible and can be converted into the quinoidal anhydrobase form through oxidation of hydroxyl groups. Selective reaction of quinoid anhydrobase with reactive groups in macromolecules held in the cell-free extracts of bacteria, like free thiol and amino groups of proteins, could help to stabilize anthocyanins and restrain their degradation. This phenomenon was also observed with different anthocyanins incubated with faecal microflora and it was attributed: (i) to the formation of an unknown, but more stable, anthocyanidin intermediate, such as a polymerized chalcone, (ii) to chemical decay or further microbial metabolism which limited phenolic compounds or (iii) to degradation of anthocyanins through reactions apart from the breakdown pathway (Fleischhut et al., 2006; Keppler & Humpf, 2005). *L. plantarum* has already been reported as having the ability to degrade some hydroxycinnamic acids (p-coumaric, caffeic, ferulic, and m-coumaric acid) and some hydroxybenzoic acids (gallic and protocatechuic acid) involving decarboxylation and reduction reactions of phenolic acid (Rodríguez, Landete, Rivas, & Muñoz, 2008). In the case of gallic acid, it was decarboxylated and pyrogallol, a powerful antioxidant, was obtained.

Hydroxybenzoic acid concentration in fruits and vegetables is generally low (Tomás-Barberán & Clifford, 2000), and as far as consumption is concerned, hydroxycinnamic acids provide larger contributions to the total polyphenol intake than benzoic acid derivatives of flavonoids, like gallic and syringic acid. *B. lactis* BB-12, *L. casei* LC-01 and *L. plantarum* IFPL722 are potentially able to increase the concentration of these products in the gastrointestinal tract (GIT) through *in situ* metabolism of the original anthocyanins or might be added as functional adjuncts in anthocyanin-based products to improve their health-giving properties.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first study reporting the enzymatic potential of single strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, for malvidin and delphinidin bioconversion. Cleavage of the glucosidic bond in the anthocyanin structure is proposed as the first step in bacterial anthocyanin bioconversion, involving β -glucosidase activity. In the case of *L. plantarum*, and *L. casei* strains, β -glucosidase activity seemed to be somehow associated with the cell-envelope, but for *B. lactis* BB-12 and *L. acidophilus* LA-5 it might be intracellular. Enzymatic pools of *B. lactis* BB-12, *L. casei* LC-01 and *L. plantarum* IFPL722 strains are able to degrade malvidin to varying degrees, by probably involving glycosidic bond cleavage, anthocyanidin ring fission and further, though not yet characterized, metabolism. New metabolites like gallic, syringic and homogentisic acids appeared due to bacterial enzymatic action on malvidin, some of which have been described as being more bioavailable or bioactive than the original molecule. These results suggest that *B. lactis* BB-12, *L. casei* LC-01 and *L. plantarum* IFPL722 strains might be applied as functional cultures to obtain more bioavailable malvidin and bioactive phenolic acids *in situ* in food products or in the human GIT, although further research would be needed to understand in depth the effect of these bacteria on anthocyanin metabolism.

Acknowledgements

The authors thank E. Lanchas for her valuable technical assistance and Dr. J.J. Perez and Dr. S. Gonzalez from the University of

Salamanca for their assistance with LC-MS analyses. Thank you also to Mr. R. Chiverton for revising the English version of this manuscript. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2004-07285-C02-01, AGL2006-05453, the Program Consolider-Ingenio 2010, FUN-C-FOOD, CSD2007-00063) and the Comunidad Autónoma de Madrid (ALI-BIRD: S-0505/AGR-0153 and CCG07-CSIC/AGR-1762). M. Ávila was funded by a *Juan de la Cierva* postdoctoral contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation and M. Hidalgo by a CSIC JAE predoctoral fellowship.

References

- Aura, A.-M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 407–429.
- Aura, A.-M., Martín-Lopez, P., O'Leary, K. A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K.-M., Poutanen, K., et al. (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*, 44(3), 133–142.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Choi, Y. B., Woo, J. G., & Noh, W. S. (1999). Hydrolysis of β -glucosidase bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 31, 189–195.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130–135.
- de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 1003–1006.
- Fleischhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., & Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various anthocyanins *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, 45(1), 7–18.
- García-Alonso, M., Minihane, A. M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Pascual-Teresa, S. (2009). Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(7), 521–529.
- García-Alonso, M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Pascual-Teresa, S. (2004). Antioxidant and cellular activity of anthocyanidins and their corresponding visitins A – studies in platelets, monocytes and human endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3378–3384.
- García-Alonso, M., Rimbach, G., Sasai, M., Nakahara, M., Matsugo, S., Uchida, Y., et al. (2005). Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(12), 1112–1119.
- Jackman, R. L., & Smith, J. L. (1996). Anthocyanins and betalains. In G. A. F. Hendry & J. D. Houghton (Eds.), *Natural food colorants* (2nd ed., pp. 244–309). London: Chapman & Hall.
- Jeon, K. S., Ji, G. E., & Hwang, I. K. (2002). Assay of β -glucosidase activity of bifidobacteria and hydrolysis of isoflavone glycosides *Bifidobacterium* sp. Int-57 in soymilk fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 8–13.
- Keppler, K., & Humpf, H.-U. (2005). Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 5195–5205.
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacteria metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, 157(9), 876–884.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 230S–242S.
- Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., & Ohta, N. (1994). Solubilization of novel isoflavone glycoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77(4), 439–441.
- Matsumoto, H., Inabam, H., Kishi, M., Tominaga, S., Hirayama, M., & Tsuda, T. (2001). Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1546–1551.
- McGhie, T. K., Ainge, G. D., Barnett, L. E., Cooney, J. M., & Jensen, D. J. (2003). Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 4539–4548.
- Nielsen, I. L. F., Dragsted, L. O., Ravn-Haren, G., Freese, R., & Rasmussen, S. E. (2003). Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2813–2820.
- Otieno, D. O., Ashton, J. F., & Shah, N. P. (2005). Stability of β -glucosidase activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. In fermented

- soymilk during processing and storage. *Journal of Food Science*, 70(4), 236–241.
- Piffaut, B., Kader, F., Girardin, M., & Metche, M. (1994). Comparative degradation pathways of malvidin 3, 5-diglucoside after enzymatic and thermal treatment. *Food Chemistry*, 50(2), 115–120.
- Pyo, Y.-H., Lee, T.-C., & Lee, Y.-C. (2005). Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Research International*, 38(5), 551–559.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956.
- Rodríguez, H., Landete, J. M., Rivas, B. d. l., & Muñoz, R. (2008). Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chemistry*, 107(4), 1393–1398.
- Tomás-Barberán, F. A., & Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1024–1032.
- Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J., & Shah, N. P. (2002). Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase-producing bacteria. *Food Microbiology and Safety*, 67(8), 3104–3113.
- Winter, J., Moore, L. H., Dowell, V. R., & Bokkenheuser, V. D. (1989). C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 55(5), 1203–1208.

ARTÍCULO 2

**“FLAVONOID-FLAVONOID INTERACTION AND ITS EFFECT
ON THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY”**

Food Chemistry (121 (2010) 691–696)



Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity

Maria Hidalgo^a, Concepción Sánchez-Moreno^b, Sonia de Pascual-Teresa^{a,*}

^a Department of Metabolism and Nutrition, Instituto del Frío, Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

^b Department of Plant Food Science and Technology, Instituto del Frío, Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2009

Received in revised form 11 December 2009

Accepted 24 December 2009

Keywords:

Antioxidant activity

Flavonoids

Interactions

Synergism

Antagonism

ABSTRACT

Flavonoids are polyphenols widely distributed in fruits and vegetables, and have been shown to be good antioxidants in different models. However, studies undertaken with the aim of predetermining the antioxidant power of a given food on the basis of its flavonoid content have, in most cases, failed due to differences between the theoretical and the calculated antioxidant power of that given product. In the present work, the antioxidant activity of eleven flavonoids (cyanidin-3-O-glucoside, malvidin-3-O-glucoside, delphinidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, pelargonidin-3-O-glucoside, catechin, epicatechin, kaempferol, myricetin, quercetin and quercetin-3- β -glucoside) was measured by two different *in vitro* tests: DPPH[•] radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP). In order to evaluate the effect of flavonoid interactions on their antioxidant power we compared the capacity of individual flavonoids with that obtained by mixing them with another flavonoid. The majority of DPPH[•] scavenging activities in these combinations promoted antagonistic effects, except for some synergistic interactions such as kaempferol paired with myricetin. In the FRAP assay, the interaction between epicatechin and quercetin-3- β -glucoside showed the highest synergistic effect, whereas myricetin with quercetin resulted in an antagonistic effect.

It can be concluded, therefore, that there are synergistic and antagonistic interactions between flavonoids that may explain the results obtained when measuring the antioxidant effect of whole food extracts. The present results may also assist in the future design of functional foods or ingredients based on their antioxidant activity.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Flavonoids are among the most studied phytochemicals found in plant foods and include a large number of different molecules which may result in diverse biological activities. Numerous studies have focused on determining flavonoid antioxidant activity, many of which have used pure compounds, calculating their individual antioxidant power and performing structure–activity relationship studies (Plumb, de Pascual-Teresa, Santos-Buelga, Cheynier, & Williamson, 1998; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). In other studies the antioxidant power of a given food sample, mainly oils (Mateos, Domínguez, Espartero, & Cert, 2003), fruits and vegetables (García-Alonso, Rimbach, Rivas-Gonzalo, & de Pascual-Teresa, 2004; Plumb et al., 1996) or tea and wine (Leung et al., 2001; Sánchez-Moreno, Larrauri, & Saura-Calixto, 1999) has been characterised in depth and, in some cases, the correlation between flavonoid composition and antioxidant power has been examined (Fernández-Pachón, Villano, García-Parrilla, & Troncoso, 2004).

When in 1936 Szent-Györgyi (Rusznayk & Szent-Györgyi, 1936) reported the presence of what he first called “vitamin P” in citrus fruits, he had already hypothesized that flavonoids and vitamin C worked synergistically to strengthen capillaries (Rusznayk & Szent-Györgyi, 1936). Subsequently, some studies showed that biological interactions took place between flavonoids and some vitamins in *in vitro* and *in vivo* models. Lotito and Fraga (1998) described the protective effect of catechin against α -tocopherol depletion in plasma. More recently, Kadoma, Ishihara, Okada, and Fujisawa (2006) demonstrated that there was a synergic antioxidant effect between δ -tocopherol and epicatechin and epigallocatechin gallate in an *in vitro* model. Frank et al. (2006) showed that the inclusion of quercetin, catechin or epicatechin in the diet of rats gave rise to an increase in α -tocopherol concentrations in blood plasma and liver.

Many studies on the antioxidant potential of flavonoids in fruits, vegetables, wine or tea have concluded that it is impossible to predict the antioxidant power of a given product by studying just one type of flavonoid or other kind of antioxidants contained in the product, such as vitamin C or E. In some cases the possible existence of synergic or antagonistic effects between the various antioxidants present in plant foods and derived products has been

* Corresponding author. Tel.: +34 915492300; fax: +34 915493627.
E-mail address: soniapt@if.csic.es (S. de Pascual-Teresa).

postulated (García-Alonso et al., 2004; Vinson, Su, Zubik, & Bose, 2001). However until now very few studies have focused on the assessment of flavonoid–flavonoid interactions in terms of antioxidant activity. Heo, Kim, Chung, and Kim (2007) did not find any synergistic effect between the assayed flavonoids by using the ABTS method and expressing results as a vitamin C equivalent. However, Pinelo, Manzocco, Nuñez, and Nicoli (2004) found an antagonistic effect when phenols interacted at three different temperatures using the DPPH method and several studies showed a synergistic antioxidant effect of flavonoids on free-radical-initiated peroxidation of linoleic acid (Rossetto et al., 2002). An antioxidant effect was observed by Pignatelli et al. (2000) with the flavonoids quercetin and catechin, indicating that these components of red wine act synergistically to inhibit platelet adhesion to collagen and collagen-induced platelet aggregation by virtue of their antioxidant effect.

In general, all results for isolated flavonoids indicate high antioxidant activity. Although the *in vitro* antioxidant properties for isolated polyphenols have already been well documented (Rivero-Pérez, Muñoz, & González-Sanjosé, 2008), in this paper we will extend this knowledge to include the antioxidant properties produced by the interaction of two flavonoids, in terms of synergistic or antagonistic effects.

To accomplish this objective we have measured flavonoid antioxidant activity and flavonoid–flavonoid interactions by employing the following two methods: scavenging of the stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical and ferric reducing antioxidant power (FRAP). In particular, we have compared the antioxidant capacity of a system containing a mixture of two flavonoids with that of each single flavonoid measured individually, in order to better understand the global antioxidant capacity of flavonoid rich products such as red wine or fruit juices. The flavonoids studied were: cyanidin-3-O-glucoside chloride, malvidin-3-O-glucoside chloride, delphinidin-3-O-glucoside chloride, peonidin-3-O-glucoside chloride, pelargonidin-3-glucoside chloride, (+)catechin, (–)epicatechin, kaempferol, myricetin, quercetin and quercetin-3-β-glucoside.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

6-Hidroxy-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 97%, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]), 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), iron (III) chloride hexahydrate, acetate buffer saline, myricetin, (+)catechin, (–)epicatechin and quercetin dihydrate were purchased from Sigma–Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). Quercetin-3-β-glucoside and kaempferol 96% from Fluka, Sigma–Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). Cyanidin-3-O-glucoside chloride, pelargonidin-3-O-glucoside chloride, malvidin-3-O-glucoside chloride, delphinidin-3-O-glucoside chloride and peonidin-3-O-glucoside chloride were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Methanol (HPLC grade) from Lab-Scan (Dublin, Ireland). Ethanol absolute 99%, HCl 37% and dimethyl sulphoxide (DMSO) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. DPPH[•] radical scavenging capacity assay

The DPPH[•] method reported by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) was used but with some modifications. DPPH[•] is a stable radical widely used to monitor the free radical scavenging abilities (the ability of a compound to donate an electron) of various antioxidants. The DPPH[•] radical has a deep violet colour due to its impaired electron, and radical scavenging can be followed spectrophotometrically by the loss of absorbance at 517 nm, as the pale

yellow nonradical form is produced. To optimise the conditions used to run the DPPH[•] assay in microplates we modified the DPPH[•] concentration, the time of reaction and the range of concentrations used for the flavonoids. As a result, we finally set the DPPH[•] concentration at 100 μM, the time of reaction at 1 h and the antioxidant concentration between 100 and 500 μM.

Briefly, 10 μl of individual flavonoid or 5 μl of each of the paired flavonoids were placed in a 96-well microplate, in order to give the same level of flavonoid concentration, then 290 μl of 100 μM DPPH[•] in methanol was added, mixed well, and after 1 h of incubation in the dark absorbance was measured at 517 nm using a microplate reader (Power Wave XS, BIOTEK). All samples were run in triplicate. The results were expressed as EC₅₀ (μM), and obtained by plotting the remaining percentage of DPPH[•] against the flavonoid concentration to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH[•] concentration by 50%.

2.3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The total antioxidant potential of a sample was also determined using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay by Benzie and Strain (1996). This method is based on reducing the power of an antioxidant compound. A potential antioxidant will reduce the ferric ion (Fe³⁺) to the ferrous ion (Fe²⁺) at low pH; the latter forms a blue complex (Fe²⁺/TPTZ), measured at 593 nm. The FRAP reagent was freshly prepared by mixing together 0.3 M acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ in 40 mM HCl and 20 mM FeCl₃ in a proportion 10:1:1 (v/v/v), respectively. Tested flavonoids were prepared at 100 μM and 200 μM in DMSO. The assay was carried out by placing 10 μl individual flavonoid at 100 μM or 5 μl at 200 μM for each of the paired flavonoid in a 96-well microplate and then adding 290 μl of FRAP reagent. In a second FRAP assay, we selected combinations of flavonoids in different concentration ratios (3:1, 2:1 and 1:1) using a fixed final concentration (200 μM). After 15 min of incubation at 37 °C and shaking, absorbance was read at 593 nm. All samples were run in triplicate. Results were compared with a standard curve prepared daily with different concentrations of Trolox and were expressed as μM trolox equivalents (TE).

2.4. Statistical analysis

The results were reported as means ± standard deviation (SD) of at least three measurements, each performed in triplicate. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means, and the least significant difference (LSD) test showed the values statistically different. Differences were considered significant at *P* < 0.05. All statistical analyses were performed with Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Inc., Rockville, MD, USA).

3. Results and discussion

It has been suggested that flavonoids have several potential health benefits due, in part, to their antioxidant activity, and recently, research on natural antioxidants, including flavonoids, has increased actively in various fields. According to Moon and Shibamoto (2009), in order to study the antioxidant activity of these compounds, it is important to choose an adequate assay based on the chemistry of the compound of interest. Some assays are concerned with electron or radical scavenging, including the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay or the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay whereas other assays are focused on reducing oxidising ability such as the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay or the Ferrous Oxidation-Xylenon Orange (FOX) assay.

Table 1
Antioxidant activity of single flavonoids and in combination measured by DPPH^a and FRAP methods.

Samples	EC ₅₀ (μM)	Difference in DPPH antioxidant activity (%)	FRAP ^a	Difference in FRAP antioxidant activity (%)
<i>Peonidin-3-O-glucoside</i>	473.9 ± 9.7		209.7 ± 13.3	
P + CY	494.0 ± 39.6	−2.2 ± 7.2	516.9 ± 27.7	−7.8 ± 0.9 ^b
P + DP	516.4 ± 1.6	−19.0 ± 1.7 ^b	446.9 ± 28.5	−5.2 ± 0.9 ^b
P + MV	544.4 ± 9.0	−13.0 ± 0.7	371.9 ± 45.3	−8.1 ± 2.8 ^b
P + PG	591.4 ± 18.4	−4.1 ± 2.4	315.5 ± 15.7	−5.3 ± 1.8
P + CAT	642.3 ± 17.8	−37.2 ± 2.4 ^b	332.1 ± 9.9	−3.3 ± 3.1
P + ECAT	550.4 ± 6.0	−26.5 ± 2.7 ^b	327.6 ± 18.5	−4.4 ± 1.6 ^b
P + K	592.4 ± 15.0	−0.3 ± 1.8	369.9 ± 33.0	−5.6 ± 0.9 ^b
P + MY	413.9 ± 7.8	−10.3 ± 0.7 ^b	499.7 ± 39.0	−4.9 ± 3.3
P + Q	523.9 ± 1.9	−41.3 ± 2.4 ^b	594.0 ± 40.0	0.1 ± 1.3
P + Q-3-G	715.1 ± 26.6	−79.4 ± 8.8 ^b	370.4 ± 20.1	−1.4 ± 0.7
<i>Cyanidin-3-O-glucoside</i>	509.8 ± 35.2		377.0 ± 9.4	
CY + DP	433.3 ± 15.2	−3.4 ± 6.2	565.1 ± 26.8	−4.7 ± 1.6
CY + MV	481.1 ± 30.2	3.9 ± 4.3	585.0 ± 40.6	0.7 ± 8.1
CY + PG	547.1 ± 46.0	1.3 ± 6.6	594.3 ± 26.1	0.0 ± 7.0
CY + CAT	495.5 ± 32.7	−41.1 ± 7.7 ^b	599.4 ± 26.2	1.1 ± 7.1
CY + ECAT	468.2 ± 28.1	−5.3 ± 4.0	585.3 ± 5.0	−2.0 ± 2.9
CY + K	517.5 ± 26.4	2.0 ± 8.4	617.4 ± 11.1	−0.3 ± 5.7
CY + MY	298.5 ± 21.7	19.6 ± 11.7 ^b	784.5 ± 21.6	1.0 ± 6.3
CY + Q	410.1 ± 19.3	−16.4 ± 14.1	711.5 ± 25.3	5.4 ± 6.0
CY + Q-3-G	522.1 ± 25.8	−45.6 ± 19.5 ^b	622.5 ± 17.9	13.1 ± 9.9 ^b
<i>Delphinidin-3-O-glucoside</i>	397.2 ± 7.7		266.0 ± 23.6	
DP + MV	484.3 ± 46.6	−9.5 ± 9.6	438.4 ± 19.0	−2.9 ± 2.6
DP + PG	547.3 ± 44.1	−4.7 ± 7.8	411.1 ± 39.4	−0.4 ± 4.9
DP + CAT	502.6 ± 18.7	−29.0 ± 3.5 ^b	419.9 ± 12.4	5.2 ± 3.7
DP + ECAT	495.4 ± 0.1	−29.6 ± 6.1 ^b	433.0 ± 7.5	7.1 ± 2.9
DP + K	505.1 ± 45.6	7.9 ± 7.8	447.7 ± 22.4	−0.6 ± 3.3
DP + MY	356.4 ± 33.9	−2.0 ± 5.6	641.7 ± 39.6	−0.4 ± 3.9
DP + Q	417.6 ± 25.0	−28.4 ± 7.8 ^b	659.5 ± 33.6	2.2 ± 5.4
DP + Q-3-G	460.0 ± 3.0	−35.5 ± 0.6 ^b	476.0 ± 13.6	2.9 ± 13.0
<i>Malvidin-3-O-glucoside</i>	482.2 ± 37.4		208.6 ± 19.6	
MV + PG	589.7 ± 18.3	−11.8 ± 7.8	353.1 ± 25.4	1.2 ± 7.2
MV + CAT	655.1 ± 47.3	−45.1 ± 4.5 ^b	329.1 ± 15.8	2.4 ± 4.1
MV + ECAT	429.6 ± 18.9	−7.3 ± 5.0	330.3 ± 17.0	2.8 ± 2.1
MV + K	759.8 ± 2.3	−20.5 ± 7.6 ^b	364.7 ± 18.1	−0.2 ± 3.0
MV + MY	386.1 ± 28.4	−0.2 ± 4.5 ^b	536.9 ± 35.6	0.4 ± 3.8
MV + Q	581.0 ± 3.4	−51.0 ± 2.7 ^b	592.7 ± 39.2	9.3 ± 3.9 ^b
MV + Q-3-G	764.1 ± 9.8	−88.1 ± 2.4 ^b	368.8 ± 22.1	11.0 ± 4.4 ^b
<i>Pelargonidin-3-O-glucoside</i>	651.0 ± 16.2		137.0 ± 11.8	
PG + CAT	814.9 ± 36.3	−52.2 ± 2.4 ^b	283.5 ± 25.3	−0.1 ± 4.9
PG + ECAT	781.0 ± 46.1	−50.7 ± 9.7 ^b	293.9 ± 27.8	1.7 ± 4.7
PG + K	855.6 ± 31.1	−24.6 ± 3.7 ^b	313.0 ± 22.0	0.9 ± 2.6
PG + MY	475.5 ± 15.2	−1.9 ± 3.0	519.3 ± 35.8	0.7 ± 5.6
PG + Q	594.7 ± 47.8	−31.8 ± 10.2 ^b	567.7 ± 35.9	13.2 ± 1.0 ^b
PG + Q-3-G	840.1 ± 24.3	−76.0 ± 6.1 ^b	323.1 ± 19.5	6.4 ± 6.4
<i>(+)Catechin</i>	380.6 ± 15.4		141.1 ± 8.1	
CAT + ECAT	462.9 ± 31.9	−14.1 ± 4.6 ^b	274.3 ± 13.3	−2.3 ± 3.0
CAT + K	539.8 ± 56.3	2.4 ± 9.1	311.2 ± 11.5	−0.4 ± 2.5
CAT + MY	377.1 ± 16.2	−10.0 ± 3.6	527.2 ± 34.4	2.5 ± 3.6
CAT + Q	357.1 ± 11.8	−7.8 ± 5.9	560.3 ± 14.3	6.7 ± 3.3 ^b
CAT + Q-3-G	360.6 ± 43.1	−4.2 ± 9.7	337.5 ± 12.2	16.0 ± 6.5 ^b
<i>(−)Epicatechin</i>	369.4 ± 26.4		148.2 ± 12.9	
ECAT + K	492.6 ± 40.5	7.2 ± 3.9	326.6 ± 15.7	0.8 ± 2.7
ECAT + MY	342.7 ± 25.3	−7.8 ± 3.3	557.7 ± 47.4	11.6 ± 4.1 ^b
ECAT + Q	318.6 ± 20.0	−2.6 ± 7.0	571.0 ± 35.9	8.8 ± 4.5 ^b
ECAT + Q-3-G	361.9 ± 10.7	−7.3 ± 12.6	362.1 ± 15.5	22.4 ± 5.6 ^b
<i>Kaempferol</i>	699.9 ± 30.2		182.2 ± 8.3	
K + MY	381.3 ± 16.2	21.7 ± 2.9 ^b	466.3 ± 30.7	0.0 ± 3.9
K + Q	382.8 ± 13.6	19.9 ± 1.0 ^b	583.4 ± 22.6	7.9 ± 2.4
K + Q-3-G	450.2 ± 24.0	13.6 ± 1.7 ^b	356.6 ± 15.1	6.0 ± 5.9
<i>Myricetin</i>	274.0 ± 5.4		330.5 ± 27.7	
MY + Q	382.8 ± 13.6	−17.9 ± 5.8 ^b	618.0 ± 35.0	−4.9 ± 1.6 ^b
MY + Q-3-G	450.2 ± 24.0	−20.8 ± 3.7 ^b	571.3 ± 30.6	12.6 ± 2.8 ^b
<i>Quercetin</i>	256.2 ± 9.2		368.2 ± 13.9	
Q + Q-3-G	321.8 ± 12.5	−16.2 ± 8.7 ^b	591.4 ± 3.4	13.3 ± 5.5 ^b
<i>Quercetin-3-β-glucoside</i>	291.5 ± 21.5		161.0 ± 9.0	

Peonidin-3-O-glucoside (P), cyanidin-3-O-glucoside (CY), delphinidin-3-O-glucoside (DP), malvidin-3-O-glucoside (MV), pelargonidin-3-O-glucoside (PG), catechin (CAT), epicatechin (ECAT), kaempferol (K), myricetin (MY), quercetin (Q), and quercetin-3-β-glucoside (Q-3-G).

^a Results expressed: as micromolar trolox equivalents (TE).

^b Within columns indicates a statistically different value from the comparison between experimental results, obtained for a solution of two flavonoids, with theoretical results, calculated by summing the effects of individual compounds measured separately. In order to determine the synergistic/antagonistic effect for DPPH and FRAP the following equations were used: Difference in DPPH antioxidant activity = $100 - [\text{mixture EC}_{50} \times 200 / (A \text{ EC}_{50} + B \text{ EC}_{50})]$; where mixture EC₅₀ is the result obtained experimentally for the mixture of two flavonoids (A and B) in the experimental conditions described in the methodological section, and A EC₅₀ and B EC₅₀ values are the EC₅₀ measured individually for each compound. Difference in FRAP antioxidant activity = $[\text{mixture FRAP value} \times 100 / (A \text{ FRAP value} + B \text{ FRAP value})] - 100$; where mixture FRAP value is the result obtained experimentally for the mixture of two flavonoids (A and B) in the experimental conditions described in the methodological section, and A FRAP value and B FRAP value are the FRAP values measured individually for each compound. In both methods, positive values are considered synergistic and negative values antagonistic effects.

Therefore, the correct evaluation of the antioxidant activity of several commercial flavonoids requires the use of more than one method, consequently, we used two methods based on fundamentally different approaches such as the DPPH[•] and FRAP methods, which are highly sensitive assays with reproducible results.

3.1. DPPH[•] radical scavenging capacity

The results obtained experimentally for the different flavonoid combinations were compared with theoretical values calculated by adding up the effects of both individual compounds analysed separately. In this way, any statistically significant effect resulting from these combinations could be established whether synergistic or antagonistic. As a consequence, it was possible to calculate percentage-wise variations in antioxidant activity for each combination of two flavonoids and compare the results with those calculated for their theoretical activity. The results obtained are summarised in Table 1 which clearly indicates that the majority of the mixtures showed a loss of antioxidant capacity compared with their theoretical values.

After comparing the EC₅₀ values of individual compounds, flavonols such as quercetin or myricetin, with two and three hydroxyl groups respectively in B-rings, showed the highest antioxidant activity. The present results are in accordance with those of other authors (Cao, Sofic, & Prior, 1997) who demonstrated that the number and pattern of hydroxyl substitutions on the B-ring are associated with the highest antioxidant activity. Moreover, it seems that the combination of catechol moiety with a double bond at C2–C3 and a hydroxyl group in position 3 makes it an extremely active scavenger (Van Acker et al., 1996).

In contrast, our study revealed that pelargonidin-3-glucoside and kaempferol, with only one hydroxyl group in the B-ring, were the individual compounds with lowest antioxidant capacity. However, when kaempferol was paired with myricetin, quercetin or quercetin-3-glucoside we obtained a statistically significant increase in antioxidant activity, so it can be described as having a synergistic effect (Fig. 1). Furthermore, in these combinations, an increase in antioxidant activity of about 20% was achieved compared with their theoretical values. In the same way, in the cyanidin-3-glucoside and myricetin-3-glucoside combination a synergistic effect was also found.

However, when we paired pelargonidin-3-glucoside, another compound with low antioxidant activity, with compounds such as catechin, epicatechin, kaempferol, quercetin or quercetin-3-glucoside, the results seemed to indicate very weak DPPH[•] scavenging activities, revealing statistically significant antagonism when real values are compared with theoretical ones.

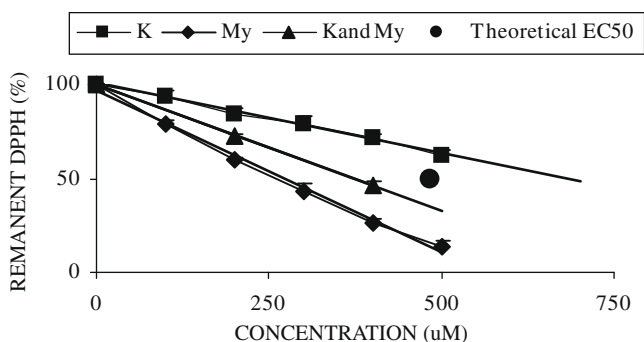


Fig. 1. Synergistic effect between kaempferol (K) and myricetin (MY), assayed by the DPPH[•] method. The theoretical EC₅₀, calculated for the mix of the standard curves of kaempferol and myricetin, is higher than the one obtained experimentally in a mixture of these flavonoids.

The structural differences existing between kaempferol and pelargonidin-3-glucoside could be responsible for the opposite effect of interaction in these mixtures, and even though kaempferol has only one hydroxyl group in the B-ring as does pelargonidin, it does contain the 2,3-double bond in the C-ring and the 4-oxo function. On the other hand, pelargonidin has a glucoside residue at C3 and an oxonium ion (O⁺) in the C-ring.

Apart from the foregoing, antagonistic effects were also found in the interactions of peonidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, malvidin-3-glucoside, catechin, epicatechin, myricetin, quercetin or quercetin-3-glucoside.

In the majority of cases, these interactions tended to have an antagonistic effect on radical scavenging capacity.

It is important to note that the strongest antagonistic reaction was found when quercetin-3-glucoside was paired with the five anthocyanins assayed in this study, which resulted in a considerable loss of antioxidant activity. Anthocyanins, frequently found in coloured fruit and vegetables, are a group of flavonoids with an exceptionally good individual scavenging capacity, a fact that has already been confirmed in published research (Borkowski, Szymusiak, Gliszczynska-Swiglo, Rietjens, & Tyrakowska, 2005; García-Alonso et al., 2005). Previous studies have asserted that anthocyanin antioxidant capacity depends on the aglycon moiety and the glycoside forms, thus explaining why the number of sugar residues at the C₃ position seems to be associated with lower activity (Rice-Evans et al., 1996). However, other authors concluded that anthocyanin glycosylation increases antioxidant capacity (Wang, Cao, & Prior, 1997; Yoshiki, Okubo, & Igarashi, 1995). On the other hand, the flavonoid quercetin which is an antioxidant occurring mainly in foods as a 3- or 4'-glucoside, and also as quercetin-3-rutinoside (commonly found in black tea) can be transformed into quercetin-3-glucoside by splitting the rhamnose molecule, consequently this flavonoid is widely distributed in fresh fruits and vegetables as well as in processed food products. Although, anthocyanins and quercetin-3-glucoside exert good antioxidant power individually, our results indicate that when these flavonoids are paired, an interaction takes place affecting their total antioxidant capacity. The tendency of flavonoids to combine when they are mixed together is well-known, hence it is possible that in these interactions a hydrogen-bonding between flavonoids may occur, decreasing the availability of the hydroxyl groups, which may in turn reduce the possibility of interaction with the radical DPPH[•].

The importance of these antagonistic interactions cannot be overstated as anthocyanins and quercetin-3-glucoside are usually present together in many fruits and vegetables as well as in red wine and fruit juices. Moreover, they are also essential components in some of the functional ingredients and foods that have been proposed over the past few years (Blando, Gerardi, & Nicoletti, 2004; Gonzalez-Molina, Moreno, & Garcia-Viguera, 2008).

From the foregoing it is evident that the significant differences in antioxidant activity can be explained by flavonoid interaction mechanisms. In conclusion, these data support the hypothesis that flavonoid interactions reduce in part, the total antioxidant activity found in food matrices, and in general, in plant foods and fruit extracts, juices and other derived products.

3.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

After assaying all the possible flavonoid combinations in pairs, we obtained a preliminary evaluation of the antioxidant capacity of the flavonoids, and in this way were able to compare the experimental results obtained for each of the paired flavonoids with the theoretical values calculated by adding up the effect of individual compounds measured separately. We were then able to establish which of these combinations produced a statistically significant ef-

Table 2

Difference in antioxidant activity between real and theoretical values for selected combination in different ratios as measured by FRAP method.

Combinations	Molar ratio				
	3: 1	2: 1	1: 1	1: 2	1: 3
CAT + Q	28.14 ± 13.7	26.4 ± 9.0	34.1 ± 10.6	36.7 ± 3.1	33.7 ± 11.2
CAT + Q-3-G	32.7 ± 8.4	48.6 ± 14.0	49.4 ± 8.2	47.7 ± 9.1	51.1 ± 6.7
CY + Q-3-G	19.9 ± 8.6	23.6 ± 6.5	35.7 ± 3.3	33.0 ± 4.5	23.3 ± 5.4
ECAT + MY	45.0 ± 2.2	45.0 ± 2.2	52.9 ± 7.3	48.4 ± 1.7	45.8 ± 5.3
ECAT + Q-3-G	56.3 ± 5.7	56.0 ± 7.6	67.7 ± 9.3	67.7 ± 9.6	55.7 ± 5.4
ECAT + Q	26.9 ± 2.5	22.0 ± 1.3	25.8 ± 1.4	18.3 ± 1.7	19.1 ± 9.6
MV + Q	18.2 ± 1.6	14.2 ± 7.0	20.5 ± 5.0	10.7 ± 2.1	8.7 ± 6.7
MV + Q-3-G	27.1 ± 4.1	37.0 ± 5.5	35.3 ± 2.2	30.8 ± 6.4	27.8 ± 5.6
MY + Q	-30.8 ± 5.7	-53.7 ± 5.6	-60.4 ± 10.0	-52.1 ± 8.5	-43.7 ± 8.3
MY + Q-3-G	38.7 ± 9.3	36.6 ± 8.4	35.1 ± 2.0	35.4 ± 4.0	38.3 ± 3.0
P + CY	2.3 ± 6.1	1.7 ± 8.4	10.5 ± 6.4	-0.7 ± 9.7	-0.8 ± 3.9
P + DP	4.9 ± 3.2	-5.2 ± 5.9	-5.2 ± 1.6	-2.0 ± 4.9	-0.5 ± 1.1
P + ECAT	8.3 ± 4.2	8.8 ± 2.6	9.7 ± 4.4	11.8 ± 3.5	9.5 ± 3.4
P + K	12.8 ± 1.8	-0.5 ± 1.9	0.1 ± 4.6	0.9 ± 6.4	13.4 ± 1.0
P + MV	1.2 ± 4.5	-5.3 ± 0.3	-9.3 ± 1.8	-6.8 ± 1.8	-7.5 ± 1.9
PG + Q	23.8 ± 5.2	22.4 ± 3.2	37.9 ± 5.7	13.0 ± 2.3	27.4 ± 4.3
Q + Q-3-G	33.4 ± 10.5	35.6 ± 5.5	37.8 ± 7.7	19.2 ± 5.6	13.4 ± 12.8

Peonidin-3-O-glucoside (P), cyanidin-3-O-glucoside (CY), delphinidin-3-O-glucoside (DP), malvidin-3-O-glucoside (MV), pelargonidin-3-O-glucoside (PG), catechin (CAT), epicatechin (ECAT), kaempferol (K), myricetin (MY), quercetin (Q), and quercetin-3-β-glucoside (Q-3-G).

Synergistic and antagonistic effect of the combinations assayed in different ratios were calculated by obtaining the differences between the real value, obtained experimentally, and the theoretical value obtained as the sum of the added concentration of both compound by using the following equation: Difference in FRAP antioxidant activity = mixture FRAP value - [(A FRAP value × A concentration) + (B FRAP value × B concentration)]. Positive values are synergisms and negative values antagonisms.

fect, either synergistically or antagonistically, with respect to their theoretical values (Table 1). Finally, in order to reveal the contribution of each flavonoid to the antioxidant activity in the mixture, different concentration ratios were assayed. Therefore, the values summarised in Table 2, show the differences in antioxidant activity found between theoretical and real values of flavonoid combinations in different concentration ratios. As can be observed, the interaction among epicatechin and quercetin-3-glucoside showed the highest antioxidant activity in every ratio. The other combinations with high synergistic effects were epicatechin with myricetin, quercetin with quercetin-3-glucoside and catechin with quercetin-3-glucoside. This last interaction is shown in Fig. 2 where the real FRAP value was higher than that calculated theoretically for each flavonoid assayed in different concentration ratios. In the case of the combination of peonidin-3-glucoside a significant synergistic effect was only found when the two compounds were mixed in a isomolar ratio while no effect was found at all the other ratios assayed.

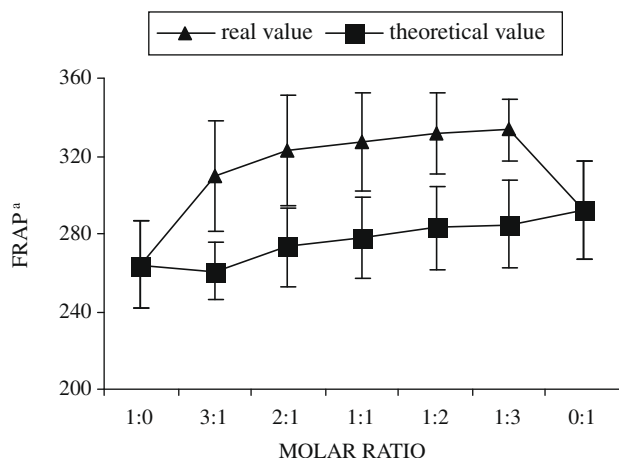


Fig. 2. Synergistic effect between catechin (CAT) and quercetin-3-β-glucoside (Q-3-G) assayed by the FRAP method. The real FRAP value is higher than that calculated theoretically for each flavonoid assayed individually. ^aResults expressed: as micromolar trolox equivalents (TE).

Likewise, there were other interactions that enhanced the antioxidant activity in solution, indicating a synergistic effect, as for instance in the case of pelargonidin with quercetin, myricetin with quercetin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside with quercetin-3-glucoside, malvidin-3-glucoside with quercetin-3-glucoside and quercetin, or quercetin with catechin and epicatechin.

In view of these results, it appears that the flavonols quercetin and quercetin-3-glucoside trigger a noticeable increase in antioxidant activity when mixed in solution with another flavonoid. The comparison of quercetin and quercetin-3-glucoside demonstrated that blocking the 3'-hydroxyl group in the C-ring of quercetin while retaining the 3',4'-dihydroxy structure in the B-ring did not decrease the antioxidant power of this compound using the FRAP method. Furthermore, in contrast with what was shown in the DPPH[•] assay, quercetin-3-glucoside promoted the most important synergistic effects in the majority of the interactions.

Apart from this, we also found that there was an important antagonistic interaction when we paired myricetin with quercetin, in a ratio 1:1. The activity obtained was significantly lower than the sum of the individual values and as a result, this antagonistic effect represented a decrease of antioxidant activity of about 9%.

In addition to the aforementioned interaction, we also found another two antagonistic effects, although in these cases, the decrease in antioxidant activity was less important. In the first case, antagonism took place when mixing peonidin-3-glucoside and malvidin-3-glucoside, corresponding with anthocyanins, which contain the 3'-OMe and the 3'- and 5'-OMe groups in the B-ring, respectively. In the second case, it occurred between peonidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside. In agreement with other authors (Rice-Evans et al., 1996), the insertion of methoxyl groups in the B-ring does not enhance antioxidant capacity when the study is carried out with individual standards, however other studies (Rivero-Pérez et al., 2008) showed that methoxyl derivatives increased antioxidant efficiency when interactions among pigments were considered.

These results indicate that flavonoid interactions, in general, increase antioxidant activity when assayed by the FRAP method. Although the values obtained from each method showed significant differences, these differences could probably be explained on the basis of the chemical nature and reactivity of the

compounds and the nature of the solvents, indeed, solvents with different polarities substantially affected antioxidant activities.

In general, the antioxidant potency of a given compound is thought to be closely linked to its structural features, such as, the ortho-dihydroxy structure in the B-ring, the 2–3-double bond in conjugation with a 4-oxo function and the presence of the 3- and 5-OH functions. In addition, antioxidant power depends on the nature of the radical and its specific reaction mechanism. These mechanisms will be influenced by the presence of glycosidic moieties, the number and position of hydroxyl and methoxy groups and the reactions that promote structural changes. Thus, the final outcome of flavonoid antioxidant effectiveness will be determined by a combination of all these structural elements. Moreover, all these structural characteristics seem to influence flavonoid interactions when assaying complex flavonoid mixtures, affecting their previously established antioxidant values or scavenging activity.

4. Conclusion

Based on these observations, we can conclude that the flavonoids present in a mixture can interact, and their interactions can affect the total antioxidant capacity of a solution. It can also be concluded that there are synergistic and antagonistic effects when flavonoids interact that may explain the results obtained when measuring the antioxidant effects of whole food extracts, such as red wine.

In the light of the results shown in this research, the importance of choosing the best combination of flavonoids, should be borne in mind when designing new dietary supplements or fortified foods. It is well-known that the development of commercial mixtures of plant phenols as sources of antioxidants can be used to enhance the health-related properties of foods, and may also increase the acceptance of the product by consumers due to the exclusion of synthetic antioxidants in their formulation.

Therefore, although we demonstrated that flavonoid interactions trigger antagonistic or synergistic effects in the antioxidant power of natural mixtures, there are other flavonoid combinations that require a more detailed study in order to better understand the mechanisms involved in these interactions.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2006-05453) and the Comunidad Autónoma de Madrid (CCG07-CSIC/AGR-1762). M. Hidalgo wishes to thank CSIC, for a JAE predoctoral fellowship (JAEP094).

References

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Blando, F., Gerardi, C., & Nicoletti, I. (2004). Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) anthocyanins as ingredients for functional foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 253–258.
- Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, I. M. C. M., & Tyrakowska, B. (2005). Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5526–5534.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure–activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 749–760.
- Fernández-Pachón, M. S., Villano, D., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513, 113–118.
- Frank, J., Budek, A., Lundh, T., Parker, R. S., Swanson, J. E., Lourenço, C. F., et al. (2006). Dietary flavonoids with a catechol structure increase alpha-tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation in vitro. *Journal of Lipid Research*, 47, 2718–2725.
- García-Alonso, M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Pascual-Teresa, S. (2004). Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisin A – Studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3378–3384.
- García-Alonso, M., Rimbach, G., Sasai, M., Nakahara, M., Matsugo, S., Uchida, Y., et al. (2005). Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 1112–1119.
- Gonzalez-Molina, E., Moreno, A. D., & Garcia-Viguera, C. (2008). Aronia-enriched lemon juice: A new highly antioxidant beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11327–11333.
- Heo, H. J., Kim, Y. J., Chung, D., & Kim, D.-O. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104, 87–92.
- Kadoma, Y., Ishihara, M., Okada, N., & Fujisawa, S. (2006). Free radical interaction between vitamin E (alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherol), ascorbate and flavonoids. *In vivo*, 20, 823–827.
- Leung, L. K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y., & Chen, Z.-Y. (2001). Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition*, 131, 2248–2251.
- Lotito, S. B., & Fraga, C. G. (1998). (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 435–441.
- Mateos, R., Domínguez, M. M., Espartero, J. L., & Cert, A. (2003). Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7170–7175.
- Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655–1666.
- Pignatelli, P., Pulcinelli, F. M., Celestini, A., Lenti, L., Ghiselli, A., Gazzaniga, P. P., et al. (2000). The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1150–1155.
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2004). Interaction among phenols in food fortification: Negative synergism antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1177–1180.
- Plumb, G. W., Chambers, S. J., Lambert, N., Bartolomé, B., Heaney, R. K., Wanigatunga, S., et al. (1996). Antioxidant actions of fruit, herb and spice extracts. *Journal of Food Lipids*, 3, 171–188.
- Plumb, G. W., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., & Williamson, G. (1998). Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research*, 29, 351–358.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology Medicine*, 20, 933–956.
- Rivero-Pérez, M. D., Muñoz, P., & González-Sanjosé, M. L. (2008). Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2815–2822.
- Rossetto, M., Vanzani, P., Mattivi, F., Lunelli, M., Scarpa, M., & Rigo, A. (2002). Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin-3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 408, 239–245.
- Rusznayk, S., & Szent-Györgyi, A. (1936). Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature*, 138, 27.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32, 407–412.
- Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D.-J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vugh, W. J. F., et al. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 331–342.
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5315–5321.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304–309.
- Yoshiki, Y., Okubo, K., & Igarashi, K. (1995). Chemiluminescence of anthocyanins in the presence of acetaldehyde and tert-butyl hydroperoxide. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 10, 335–338.

ARTÍCULO 3

**“POTENTIAL ANTI-INFLAMMATORY, ANTI-ADHESIVE,
ANTI/ESTROGENIC, AND ANGIOTENSIN-CONVERTING
ENZYME INHIBITORY ACTIVITIES OF ANTHOCYANINS AND
THEIR GUT METABOLITES”**

Genes Nutrition (7 (2012) 295–306)

Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites

Maria Hidalgo · Sonsoles Martin-Santamaria · Isidra Recio ·
Concepcion Sanchez-Moreno · Beatriz de Pascual-Teresa ·
Gerald Rimbach · Sonia de Pascual-Teresa

Received: 31 August 2011 / Accepted: 13 December 2011 / Published online: 5 January 2012
© Springer-Verlag 2011

Abstract Epidemiological studies have indicated a positive association between the intake of foods rich in anthocyanins and the protection against cardiovascular diseases. Some authors have shown that anthocyanins are degraded by the gut microflora giving rise to the formation of other breakdown metabolites, which could also contribute to anthocyanin health effects. The objective of this study was to evaluate the effects of anthocyanins and their breakdown metabolites, protocatechuic, syringic, gallic, and vanillic acids, on different parameters involved in atherosclerosis, including inflammation, cell adhesion, chemotaxis, endothelial function, estrogenic/anti-estrogenic activity, and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. From the assayed metabolites, only protocatechuic acid exhibited a slight inhibitory effect on NO production and TNF- α secretion in LPS-INF- γ -induced macrophages. Gallic acid caused a decrease in the secretion of MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 in endothelial cells. All

anthocyanins showed an ACE-inhibitory activity. Delphinidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, and gallic acid showed affinity for ER β and pelargonidin and peonidin-3-glucosides for ER α . The current data suggest that anthocyanins and their breakdown metabolites may partly provide a protective effect against atherosclerosis that is multi-causal and involves different biochemical pathways. However, the concentrations of anthocyanins and their metabolites, as used in the present cell culture and in vitro assays mediating anti-inflammatory, anti-adhesive, anti-estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities, were often manifold higher than those physiologically achievable.

Keywords Anthocyanins · Atherosclerosis · Metabolites · Phenolic acids · Estrogen receptor

Introduction

Polyphenolic substances, such as anthocyanins, exert a great variety of physiological activities responsible for the health effects attributed to some foods, including a reduced risk of cardiovascular diseases. This is partly due to their anti-inflammatory properties (González-Gallego et al. 2010; Landberg et al. 2011; Rotelli et al. 2003), antioxidant and free radical scavenging activities (García-Alonso et al. 2009; Gray and DeWitt 1999; Kahkonen and Heinonen 2003; Matsumoto et al. 2002; Tsuda et al. 1994; Wang et al. 1997), peroxidation inhibition (Tsuda et al. 1996), and estrogenic/anti-estrogenic activity (Cassidy et al. 2003). It has been largely proven that the beneficial potential of polyphenols as part of a healthy diet cannot be only explained by their antioxidant characteristics (Virgili and Marino 2008).

M. Hidalgo · C. Sanchez-Moreno · S. de Pascual-Teresa (✉)
Institute of Food Science, Food Technology and Nutrition
(ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), Ciudad
Universitaria, José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain
e-mail: soniapt@ictan.csic.es

S. Martin-Santamaria · B. de Pascual-Teresa
Department of Chemistry, Facultad de Farmacia, Universidad
San Pablo CEU, Boadilla del Monte, 28668 Madrid, Spain

I. Recio
Instituto de Investigacion en Ciencias de la Alimentacion
(CIAL, CSIC-UAM), Campus de la Universidad Autonoma
de Madrid, Nicolas Cabrera, 9, 28049 Madrid, Spain

G. Rimbach
Institute of Human Nutrition and Food Science,
Division of Food Science, Christian-Albrechts-University Kiel,
Hermann-Rodewald-Strasse 6, 24118 Kiel, Germany

One of the biological mechanisms by which flavonoids exhibit anti-inflammatory effects appears to be associated with the inhibition of nitric oxide (NO) production (Valance and Leiper 2002). A critical step in both inflammation and atherosclerosis is the adhesion of circulating monocytes to vascular endothelial cells, which involves vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Studies in vitro suggest that flavonoids participate in the prevention and attenuation of inflammatory diseases by decreasing ICAM-1 and VCAM-1 levels (Kwon et al. 2005; Lotito and Frei 2006). In addition, dietary anthocyanins and hydroxycinnamic acids have been reported to reduce TNF- α -induced up-regulation of various inflammatory mediators such as ICAM-1 or MCP-1. Therefore, the ability of polyphenols to mediate inflammatory processes is likely to contribute to their antiatherogenic properties.

The effect of flavonoids on the arterial wall due to their estrogenic activity is well known. Flavonoids reduce the risk of cardiovascular diseases (Kris-Etherton et al. 2002), decrease serum cholesterol, low-density lipoproteins (LDL) and triglyceride levels (Ricketts et al. 2005), prevent osteoporosis (Dang and Lowit 2005), and improve menopausal symptoms (McCann et al. 2005). Notably, work has already shown that the estrogenic properties of wine flavonoids including anthocyanins are due, in part, to their ability to bind the estrogen receptor (Chalopin et al. 2010; Schmitt and Stopper 2001).

In addition, flavonoids have been suggested to decrease cardiovascular risk by reducing levels of angiotensin II, a well-known proinflammatory mediator (Naruszewicz et al. 2007). It has already been reported that some anthocyanin-containing foods as well as delphinidin inhibit ACE activity (Actis-Goretta et al. 2006; Lacaille-Dubois et al. 2001; Persson et al. 2009).

Anthocyanins intake in humans has been estimated to be between 3 and 215 mg/day (Chun et al. 2007; Frankel et al. 1995; Pérez-Jimenez et al. 2011; Wu et al. 2006). Most studies have shown very low bioavailability of anthocyanins based only on the measurement in plasma or urine of the original anthocyanins and their conjugated metabolites, glucuronidated, and sulfated anthocyanins (Manach et al. 2005). More recently, it has been established that the intestinal microflora plays a key role in the metabolism of anthocyanins. After ingestion, anthocyanins can be hydrolyzed by intestinal glucosidases and the resulting aglycones are further metabolised in the large intestine to other breakdown metabolites such as protocatechuic, gallic, syringic, and vanillic acids (Avila et al. 2009; Forester and Waterhouse 2008; Keppler and Humpf 2005; Vitaglione et al. 2007). Moreover, gallic acid has been determined in plasma after its ingestion at levels as high as 1.8 $\mu\text{mol/L}$ in its original form and at 2.2 $\mu\text{mol/L}$ as its derivative 4-*O*-

methylgallic acid (Shahrzad and Bitsch 1998; Shahrzad et al. 2001). Therefore, metabolites produced by the intestinal microflora could account partly for the health benefits associated with anthocyanin consumption in humans.

The aim of this study was to further elucidate the potential mechanisms by which anthocyanins and their metabolites reduce the initial stages of atherosclerosis. Specifically, we have studied the effect of anthocyanins and their metabolites on (1) NO production and TNF- α secretion in macrophages, and (2) ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 secretion in endothelial cells. The ACE-inhibitory activity of anthocyanins and their metabolites was also measured. Finally, their ER α - and ER β -binding ability was measured. Docking studies helped to rationalize selectivity on ERs.

Materials and methods

Chemicals

Cyanidin-3-*O*-glucoside, pelargonidin-3-*O*-glucoside, malvidin-3-*O*-glucoside, delphinidin-3-*O*-glucoside, and peonidin-3-*O*-glucoside were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Acetate buffer saline, neutral red, Griess reagent, crystal violet, LPS (lipopolysaccharide), human recombinant TNF- α , mouse recombinant IFN- γ , 17- β -estradiol, PBS, Tween-20, BSA, ACE (peptidyl-dipeptidase A, EC 3.4.15.1), and the phenolic acids: gallic, syringic, protocatechuic, vanillic, sinapic, homogentisic, 4-hydroxybenzoic, phloroglucinol, 3-(2',5'-dimethoxybenzoyl) propionic (DMB propionic), coumaric and caffeic acids were purchased from Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). Ethanol 99%, glacial acetic acid, and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was acquired from Fisher (Madrid, Spain). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin, L-glutamine, and nonessential amino acids were purchased from Lonza (Barcelona, Spain). Estradiol [2,4,6,7,16,17- ^3H (N)] and scintillation counting liquid (Optifase HiSafe2) were obtained from Perkin-Elmer (Salem, MA, USA). Estrogen receptors α and β (human recombinant produced in insect cells) were purchased from Invitrogen (Barcelona, Spain).

Macrophages

RAW 264.7 cells, a murine monocyte macrophage cell line, were maintained at 37°C in 5% CO₂ according to standard protocols (Rimbach et al. 2000). The medium consisted of DMEM with 4.5 g/L glucose and L-glutamine

supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (5,000 U/mL). For experiments, cells were harvested with trypsin–EDTA and macrophages were plated in 24-well plates at a density of 5×10^4 in 0.5 mL of medium for the cytotoxicity test or in 6-well plates at a density of 2×10^5 in 2 mL of medium, for nitrite and TNF- α measurement. Finally, cells were cultured for 72 h until they reached 80% confluence. Cells in 6-well plates were treated with gallic, vanillic, protocatechuic, and syringic acids in a range of concentrations between 0.01 and 500 μ M or DMSO (<0.1%) as follows; four different treatments were performed. (A) Cells were pre-treated for 3 h with the different compounds, washed twice with PBS, and then stimulated with 1 μ g/mL LPS for 24 h. (B) Cells were pre-treated with the different compounds for 3 h, washed twice with PBS, and then stimulated with 1 μ g/mL LPS plus 1,000 U/mL IFN- γ for 24 h. (C) Cells were co-incubated with the different compounds at 200 μ M together with 1 μ g/mL LPS for 24 h. (D) Cells were co-incubated with the different compounds at 200 μ M and with 1 μ g/mL LPS plus 1,000 U/mL IFN- γ simultaneously for 24 h. For all these experiments, control cells were grown under identical conditions but were not exposed to the test compound or LPS/IFN- γ . For the cytotoxic assay, cells were treated with all compounds at the maximal concentration used in the NO production assay.

Endothelial cells

EA.hy 926 cells, a cell line derived from human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), were a generous gift from Prof. C.-J. S. Edgell, University of North Carolina at Chapel Hill. EA.hy 926 cells were generated by fusion of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with the human lung carcinoma cell line A549 and have been extensively used as a cell model for endothelial function (Fuchs et al. 2005). Cells were grown in DMEM medium containing 4.5 g/L glucose and L-glutamine and supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (5,000 U/mL). Cells were harvested with trypsin–EDTA and seeded in 0.5 mL of medium in 24-well plates or 2 mL of medium in 6-well plates and cultured until they reached 80% confluence. After pre-treatment in 6-well plates with 10 and 100 μ M of gallic, vanillic, protocatechuic and syringic acids for 16 h, cells were stimulated with 10 ng/mL TNF- α for 6 h.

Estrogen receptor (ER) competitive binding assay

The binding activity of anthocyanins and acids to human ER was determined using a radioactivity assay based on the ability of the different compounds to compete with

³H-labeled estradiol for the estrogen receptor. For the ER β - and ER α -binding assay, the corresponding pure estrogen receptor was used at 2.4 nM together with 5 nM tritium-labeled estradiol ([2,4,6,7,16,17-³H]estradiol). Unlabeled estradiol, anthocyanins, and acids were prepared in DMSO (<0.5%) and diluted in PBS-T (PBS + 0.15% Tween20) including receptors and Estradiol-H^{3*}. Briefly, the same volume of each compound, Estradiol-H^{3*}, and receptor were mixed in a final volume of 150 μ L, thus the different compounds were tested at a concentration ranging from 1 to 200 μ M. The mixture was incubated for 4 h at 23°C to allow receptor binding. Afterward, 50 μ L of charcoal (charcoal 0.1 g/mL and BSA 0.02 g/mL) was added and the samples kept on ice for 15 min before being centrifuged at 6,000 \times g for 5 min to remove the non-bound Estradiol-H^{3*}. An aliquot of this supernatant (150 μ L) was added to 4 mL of scintillation counting liquid. The bound [³H] estradiol was measured in a WinSpectral 1414 Liquid Scintillation Counter (Beckman, LS 6500). Three independent experiments containing three replicates were performed for each compound tested. Results are expressed as the percentage of specific binding of [³H] estradiol to ER versus log of competitor concentration. IC₅₀ values represent the concentration of test compound required to displace 50% [³H] estradiol from the receptor. IC₅₀ values were determined by non-linear regression fitting of experimental data to a sigmoid equation.

Docking studies

Geometries of compounds X–Y were first optimized using the ab initio quantum chemistry program Gaussian 03 (Frisch et al. 2004) and the B3LYP/3-21G* basis set. As macromolecules, the X-ray structures of estrogen receptor complexes with genistein were chosen (PDB codes: 1x7r for ER α and 1x7j for ER β). Crystallographic water molecule close to Arg394 (ER β Arg346) and Glu353 (ER β Glu305) were kept as they were considered to be part of the binding site. Different conformers of the ligands were docked using the Lamarckian genetic algorithm implemented in AutoDock 3.1 (Morris et al. 1998) by randomly changing the torsion angles and overall orientation of the molecule. A volume for exploration was defined in the shape of a three-dimensional grid (80 \times 80 \times 90 Å^3) with a spacing of 0.375 Å that enclosed the binding site and included the residues that are known to be crucial for activity. At each grid point, the receptor's atomic affinity potentials for carbon, aromatic carbon, oxygen, nitrogen, sulfur, and hydrogen atoms were precalculated for rapid intra- and intermolecular energy evaluation of the docking solutions for each ligand. The original Lennard–Jones and

hydrogen-bonding potentials provided by the program were used. The parameters for the docking using the LGA were identical for all docking jobs. After docking, the 100 solutions were clustered in groups with root mean square deviations less than 1.0 Å. The clusters were ranked by the lowest energy representative of each cluster.

Cell viability

The uptake of neutral red dye was used to assess cell viability as described previously (Valacchi et al. 2001). Macrophages and Ea.hy 926 cells were pre-treated in 24-well plates with the different test compounds for 24 h. After incubation, the culture medium was removed and replaced with fresh medium containing 50 µg/mL of neutral red. Following incubation for 2 h at 37°C, the medium was removed and the cells extracted using a solution comprising 50:49:1 (v/v/v) ethanol, water, and glacial acetic acid. Absorbance at 540 nm was recorded using a microplate reader (Power Wave XS, BIOTEK). For all cell culture experiments, compounds were dissolved in DMSO. The final DMSO concentration in the cell culture medium was 0.1% (v/v) or less. Pre-treatment for RAW 264.7 macrophages with up to 500 µM and treatment for Ea.hy 926 with up to 100 µM of any of the assayed compounds did not affect cell viability.

NO production

NO production was assessed by the measurement of nitrite concentration (NO_2^-) in the medium using the Griess reaction (Wang and Mazza 2002b). Supernatants of cultured macrophages were collected and deproteinized with 0.3 M NaOH and 0.3 M ZnSO_4 . An equal volume of the Griess reagent (1% sulfanilamide/0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H_3PO_4) and the deproteinized samples were incubated for 10 min at room temperature protected from light. The nitrite concentration was determined by measuring the absorbance at 548 nm against a standard curve for sodium nitrite (Park et al. 2000).

TNF- α secretion in RAW 264.7 macrophages

Supernatants from RAW 264.7 macrophages were collected for TNF- α secretion measurements as described above for NO production measurements. Upon collection, samples were centrifuged at 15,700×*g* for 10 min and the supernatants kept at −80°C until analysis. TNF- α secretion was measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Mouse TNF- α immunoassay, eBioscience).

Secretion of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) by Ea.hy 926 cells

Upon collection of the supernatant from Ea.hy 926 cells, samples were centrifuged at 15,700×*g* for 10 min and the supernatants were kept at −80°C until analysis. The secretion of MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 by Ea.hy 926 cells was measured using commercially available ELISA kits (Diaclone, Bionova scientific).

Determination of ACE-inhibitory activity

ACE-inhibitory activity was measured by fluorescence using the method of Sentandreu and Toldrá (2006) with some modifications. Briefly, ACE (peptidyl-dipeptidase A, EC 3.4.15.1) working solution was diluted with 0.15 M Tris buffer (pH 8.3) containing 0.1 µM ZnCl_2 with 0.04 U/mL of enzyme in the final reaction solution. A total of 40 µL of this working solution (or distilled water for the blank) was added to each microtiter plate well, with another 40 µL of distilled water for the blank (B) or 40 µL control (C) or 40 µL samples (S). The enzyme reaction was started by adding 160 µL of 0.45 mM *o*-Abz-Gly-*p*-Phe(NO_2)-Pro-OH (Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland) dissolved in 150 mM Tris-base buffer (pH 8.3), containing 1.125 M NaCl, and the mixture was incubated at 37°C. The fluorescence generated was measured at 30 min using a multiscan microplate fluorimeter (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany). 96-well microplates (Porvair, Leatherhead, UK) were used. Excitation and emission wavelengths were 350 and 420 nm, respectively. The software used to process the data was FLUOstar control (version 1.32 R2, BMG Labtech).

The ACE-inhibitory activity was evaluated in 11 phenolic acids: gallic, protocatechuic, syringic, vanillic, synapic, homogentisic, hydroxybenzoic, phloroglucinol, coumaric, caffeic, and DMB propionic acid and five anthocyanins: cyanidin-3-*O*-glucoside, malvidin-3-*O*-glucoside, delphinidin-3-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-glucoside, and pelargonidin-3-*O*-glucoside. All samples were diluted in distilled water or ethanol–water 30/70 (v/v).

The activity of each sample was tested in triplicate. Inhibitory activity was expressed as the concentration required to inhibit the original ACE activity by 50% (IC_{50}). The formula applied to calculate the percentage of ACE-inhibitory activity was: $100 - (C - S)/(C - B)$, where *C* is the fluorescence of ACE with *o*-Abz-Gly-*p*-Phe(NO_2)-Pro-OH (fluorescence substrate) and without inhibitor, *S* is the fluorescence of ACE with *o*-Abz-Gly-*p*-Phe(NO_2)-Pro-OH and with sample as inhibitor, and *B* is the fluorescence

of the fluorescent substrate *o*-Abz-Gly-*p*-Phe(NO₂)-Pro-OH. This parameter was plotted versus sample concentration and non-linear logarithmic adjustment was performed as indicated by Quirós et al. (2007) to estimate IC₅₀.

Statistical analysis

The results were reported as means ± standard deviation (SD) of at least three measurements or two in the case of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1, each performed in triplicate. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means, and the least significant difference (LSD) test showed the values statistically different. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed with Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Inc., Rockville, MD, USA).

Results and discussion

Effect of phenolic acids on NO production and TNF- α secretion in LPS and LPS/IFN- γ -stimulated macrophages

Untreated macrophages did not produce detectable amounts of NO after the 24-h incubation, but stimulation of macrophages with LPS increased NO production significantly (62.9 ± 20.2 NO nmol/mg protein). A synergistic effect was observed when IFN- γ was added simultaneously with LPS such that NO production was further increased (100.1 ± 9.0 nmol/mg protein). In the present study, gallic, vanillic, and syringic acids did not inhibit NO production in activated macrophages. Protocatechuic acid slightly but significantly inhibited NO production in a dose-dependent manner between 0 and 100 μ M, reaching an inhibition higher than 25% at 100 μ M compared to LPS-treated control and by 13% at 100 μ M compared to LPS + IFN- γ -treated control (Table 1).

When we co-treated macrophages with protocatechuic acid (10 μ M) and LPS simultaneously, we found a 20% reduction in the NO content of the media despite observing no significant reduction when cells were pre-treated with 10 μ M protocatechuic acid 3 h prior to LPS stimulation. In addition, co-incubation of macrophages with 10 μ M protocatechuic acid together with LPS + IFN- γ , caused a larger inhibition of NO production (29%) compared to pre-treatment with 10 μ M protocatechuic acid before cytokine stimulation (Table 2). This enhanced inhibition of NO production seen with co-incubation compared to with pre-treatment might be a result of a direct chemical interaction between the protocatechuic acid and the stimuli used.

Earlier studies have shown that the anti-inflammatory action of flavonoids is mediated via their inhibition of iNOS

Table 1 Effect of protocatechuic acid on the inhibition of nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages

Protocatechuic (μ M)	Inhibition of NO production (%)	
	LPS 1 μ g/mL	LPS 1 μ g/mL + IFN- γ 1,000 U/mL
25	16.2 ± 3.3*	4.3 ± 1.3*
50	21.3 ± 3.4*	6.1 ± 0.3*
100	27.4 ± 5.7*	12.7 ± 3.3*

Cells were pre-treated with protocatechuic acid for 3 h and then stimulated for 24 h with LPS (1 μ g/mL) or LPS (1 μ g/mL) + IFN- γ (1,000 U/mL). Data were compared to activated controls treated with LPS 1 μ g/mL (62.9 ± 20.2 nmol/mg protein) or LPS 1 μ g/mL + IFN- γ 1,000 U/mL (101.1 ± 9.0 nmol/mg protein). Data derived from at least three independent experiments performed in triplicate and are expressed as means ± SD

* Statistical significance: $P < 0.05$ comparing the value with control

Table 2 Effect of protocatechuic acid on nitric oxide inhibition in RAW 264.7 macrophages using two different experimental conditions

Protocatechuic (μ M)	Inhibition of NO production (%)	
	LPS 1 μ g/mL	LPS 1 μ g/mL + IFN- γ 1,000 U/mL
Pre-treated	2.4 ± 16.9	3.7 ± 3.3
Co-treated	19.7 ± 7.5*	29.3 ± 4.1*

Cells pre-treated with 10 μ M protocatechuic acid for 3 h and then stimulated for 24 h with LPS (1 μ g/mL) or LPS (1 μ g/mL) + IFN- γ (1,000 U/mL) and cells co-incubated with protocatechuic acid and LPS (1 μ g/mL) or LPS (1 μ g/mL) + IFN- γ (1,000 U/mL) for 24 h. Data were compared to activated control. Experiments performed in triplicate, and data are expressed as means ± SD

* Statistical significance: $P < 0.05$ comparing the value with control

protein and mRNA expression as well as their inhibition of nuclear factor kB (NF-kB) and STAT-1 activation, which are involved in the expression of several inflammatory genes (Chen et al. 2005; Hämäläinen et al. 1999).

We next assessed the effect of anthocyanin metabolites on TNF- α secretion. We found that exposure of macrophages to LPS led to TNF- α secretion (3.0 ± 0.1 ng TNF- α /mg protein), and that exposure to both LPS and IFN- γ together induced a synergistic effect on TNF- α secretion (11.4 ± 1.1 ng TNF- α /mg protein). Similar to the results obtained for NO production, we found that pre-treatment for LPS-stimulated cells with protocatechuic acid at concentrations higher than 10 μ M caused a reduction in TNF- α secretion, with a significant inhibition at 100 μ M protocatechuic acid of 39%. For cells treated with LPS + IFN- γ together, a low but significant inhibition of TNF- α secretion was observed only by protocatechuic acid at 50 and 100 μ M (11.1 and 21.5%, respectively). Co-incubation with the other phenolic acids and stimulus did not affect TNF- α secretion. No effect on TNF- α was shown for any of

the other polyphenols assayed, vanillic, protocatechuic, and syringic acids in our experimental conditions.

Monocyte-derived macrophages are the principal inflammatory cells in atheromas. Their activation is crucial to the progression of multiple inflammatory diseases such as septic shock, chronic inflammation, and atherosclerosis, via the release of inflammatory and cytotoxic mediators like cytokines or NO (Tamir and Tannenbaum 1996). In the present study, we have shown that exposing macrophages to LPS and IFN- γ simultaneously induces a synergistic effect in terms of NO production as well as TNF- α secretion, in accordance with other authors (Orlicek et al. 1996).

Studies in the literature investigating the effects of anthocyanins on NO production and TNF- α secretion are controversial. García-Alonso et al. (2004) did not find an effect of anthocyanins on NO production or TNF- α secretion when used to pre-treat RAW 264.7 macrophages 24 h prior incubation with LPS. In contrast, Hämäläinen et al. (1999) observed an inhibition of NO production as well as of iNOS protein and mRNA expression with pelargonidin treatment for macrophages exposed to an inflammatory stimulus (LPS). Also, Wang and Mazza (2002a) demonstrated an inhibitory effect of anthocyanins on LPS-induced NO production in macrophages.

Recently, Long et al. (2010) have shown that some flavonoids may increase the levels of hydrogen peroxide in the cell culture medium, thereby possibly affecting also some of the parameters that have been measured within the present. This increase in H₂O₂ in response to the flavonoid treatment may be due to a rapid degradation of some flavonoids at neutral pH and 37°C. This has been reported for anthocyanins such as delphinidin chloride, an extremely unstable compound, and may have also occurred in terms of its 3-glucoside (Avila et al. 2009). Furthermore, Long et al. (2010) demonstrated that different cell culture media may have different effects on H₂O₂ production for the same polyphenol test compound. Thus, compound instability and generation of H₂O₂ should be taken into account in interpreting effects of anthocyanins in cultured cells (Long et al. 2010).

Related to our findings, Yan et al. (2004) demonstrated that protocatechuic acid isopropyl ester reduced plasma TNF- α , NO, and hepatic malondialdehyde levels in a mouse model of septic shock induced by LPS and D-galactosamine. In our study, protocatechuic acid exhibited a protective effect in LPS/IFN- γ -induced macrophages by inhibiting the overproduction of inflammatory mediators, namely NO and TNF- α .

In our work, and in accordance with other studies (Terra et al. 2007), we compared the ability of anthocyanin metabolites to inhibit NO production in macrophages using four different treatment protocols (pre-incubation with polyphenols and activation with LPS alone or LPS plus

IFN- γ , and co-incubation with polyphenols and LPS alone or LPS plus IFN- γ). When macrophages were co-incubated simultaneously with the test compound and stimulus, protocatechuic acid was found to exhibit the strongest inhibition of NO secretion. In this case, we propose that protocatechuic acid acts by scavenging NO radicals or by a direct interaction with LPS or IFN- γ . However, the high level of inhibition of NO production and TNF- α secretion observed in cells pre-incubated with protocatechuic acid before LPS activation may be due to different mechanisms of action of flavonoids, as described above.

It needs to be considered that the concentrations of protocatechuic acid, which inhibited NO secretion in our cell culture experiments, were very high and rather not in the physiological range. Protocatechuic acid has been detected in plasma (human and rat) at concentrations that are around 200 nmol/L, which is 100-fold higher than the original anthocyanins concentration in plasma (between 1 and 10 nmol/L) (Caccetta et al. 2000) but still very much lower than the concentrations used in our cell culture experiments.

Our results suggest that foods rich in polyphenols, which may lead to elevated levels of protocatechuic acid in plasma, could be beneficial in the prevention of inflammatory diseases since they reduce the production of the cytotoxic oxidative stress mediator NO as well as the production of TNF- α , a crucial cytokine for the synergistic induction of NO synthesis.

Effect of phenolic acids on MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 secretion in endothelial cells

Untreated EA.hy 926 cells released very low levels of MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 into the media. However, when treated with TNF- α (10 ng/mL) to mimic pro-inflammatory conditions, there was a marked increase in the secretion of MCP-1 (2.2 ng/mL \pm 0.3), ICAM-1 (0.9 ng/mL \pm 0.1), and VCAM-1 (4.9 ng/mL \pm 3.6). Pre-treatment with gallic acid elicited a statistically significant dose-dependent decrease in the secretion of MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 at concentrations \geq 10 μ M compared with activated control cells (Table 3). None of the other polyphenols assayed, vanillic, protocatechuic, and syringic acids, showed any effect on the secreted levels of MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 in our experimental conditions.

Many epidemiological studies have reported that moderate wine consumption exerts a protective effect against cardiovascular diseases (Estruch 2000; Gronbaek et al. 2000). In addition, clinical studies have demonstrated that daily intake of wine reduces monocyte adhesion and circulating markers of inflammation (Badia et al. 2004; Estruch et al. 2004). Moreover, Sacanella et al. (2007) showed a more potent effect of red wine versus white wine, possibly

Table 3 Effect of gallic acid on MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 secretion in Ea.hy 926

Gallic acid (μM)	MCP-1 (%)	ICAM-1 (%)	VCAM-1 (%)
0	100	100	100
1	96.2 \pm 5.0	94.5 \pm 4.4	88.0 \pm 38.3
10	85.7 \pm 3.1*	91.9 \pm 0.6*	76.2 \pm 13.7*
50	81.2 \pm 2.4*	88.6 \pm 5.6	50.8 \pm 5.9*
100	78.9 \pm 1.8*	79.9 \pm 0.6*	41.2 \pm 4.9*

Cells were pre-treated with gallic acid (0, 1, 10, 50, and 100 μM) for 16 h and then activated 6 h with TNF- α (10 ng/mL). Data were compared to TNF- α -stimulated controls (not treated with gallic acid). Data were derive from three independent experiments performed in duplicated and are expressed as means \pm SD

* Statistical significance: $P < 0.05$ comparing the value with control

due to its higher anthocyanin content. A suppression of NF- κB in white blood cells by red wine was suggested to play a key role in its anti-inflammatory effects (Blanco-Colio et al. 2000). In accordance with these studies, we observed a significant reduction in MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 levels when endothelial cells were pre-treated with gallic acid. This reduction was especially marked in the case of VCAM-1. Previous studies have reported that endothelial cells in human atherosclerotic lesions increase cell adhesion molecules (CAMs) and MCP-1. Therefore, gallic acid might be an effective protector against monocyte recruitment in inflammatory vessels and may prove useful in the prevention of atherosclerotic lesion development due, in part, to a decrease in MCP-1, which promotes monocytes infiltration into the arterial wall.

Determination of ACE-inhibitory activity

We assessed the ACE-inhibitory activity of the potentially bioactive phenolic acids and anthocyanins by measuring their IC_{50} values (the concentration required to inhibit the original ACE activity by 50%). The ACE-inhibitory activity was first determined for all the test compounds at a concentration of 500 μM , and only those ones showing a percentage of inhibition higher than 50% where used to calculate their corresponding IC_{50} vaules. The ACE-inhibitory activity was then tested at 6 different concentrations between 1 and 500 μM in order to obtain a dose–response curve. Data are summarized in Table 4. The anthocyanins inhibited ACE activity in a dose-dependent manner, with delphinidin-3-glucoside being the most active ($\text{IC}_{50} = 65.4 \mu\text{M}$) followed closely by cyanidin-3-*O*-glucoside ($\text{IC}_{50} = 70.8 \mu\text{M}$), pelargonidin-3-*O*-glucoside ($\text{IC}_{50} = 77.7 \mu\text{M}$), malvidin-3-*O*-glucoside ($\text{IC}_{50} = 83.9 \mu\text{M}$), and peonidin-3-*O*-glucoside ($\text{IC}_{50} = 104.6 \mu\text{M}$). This observation suggests that the presence of a hydroxyl group, as well as the *O*-glycosides structure, enhances the inhibitory activity. We found that of all of the phenolic acids, only

Table 4 ACE-inhibitory activity of anthocyanins and phenolic acids

Sample	IC_{50} (μM)
Gallic acid	332.4 \pm 40.1
Caffeic acid	157.3 \pm 16.1
Coumaric acid	504.2 \pm 31.5
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	83.9 \pm 5.1
Delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside	65.4 \pm 4.0
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	70.8 \pm 2.0
Pelargonidin-3- <i>O</i> -glucoside	77.7 \pm 2.3
Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside	104.6 \pm 5.8

IC_{50} : concentration of compound needed to inhibit the original ACE activity by 50%

caffeic, gallic, and coumaric acids exhibited a marginal ACE-inhibitory activity with IC_{50} values of 157.3, 332.4, and 504.2 μM , respectively. All the other assayed compounds, protocatechuic, syringic, vanillic, synapic, homogentisic, hydroxybenzoic, phloroglucinol, and DMB propionic acid showed an inhibition of ACE lower than 50% for a 500 μM concentration.

The *in vitro* ACE-inhibitory activity of flavonoids is due to the generation of chelate complexes with the zinc atom within the active center of ACE (García-Saura et al. 2005). Free hydroxyl groups of phenolic compounds are suggested to be important structural moieties to chelate the zinc ions, thus inactivating the ACE activity. It may therefore be the hydroxyl groups within the anthocyanins and phenolics acids that are responsible for their ACE-inhibitory activity. In fact, ACE-inhibitory activity has been already demonstrated in some compounds derived from plants such as flavonoids (Wille et al. 2001), terpenoids (Morigiwa et al. 1986), peptides (Kinoshita et al. 1993), and procyanidins (Wagner and Elbl 1992).

It is therefore likely that anthocyanins and their breakdown metabolites, phenolic acids, have hypotensive and protective effects on endothelial function due, at least in part, to their ACE-inhibitory effect since angiotensin II regulates arterial blood pressure, adhesion molecule expression, cytokines, chemokines, and growth factors within the arterial wall.

Relative affinity for ER α and ER β

The first step to determine the estrogenic activity of a given compound is to measure the binding of this potential ligand to the estrogenic receptor. In general, the affinity of flavonoids to bind to ER α and β is lower than that of 17- β -estradiol. However, some studies have confirmed that genistein, daidzein, and equol have a good affinity for ER, especially for ER β (Mueller et al. 2004).

The ER-binding affinity of anthocyanins and their metabolites was determined in a radioactivity assay by

Table 5 Relative affinity of anthocyanins and phenolic acids for ER α and ER β

Compound	ER α IC ₅₀ (μ M)*	ER β IC ₅₀ (μ M)*
Delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside	NA	63.2 \pm 0.8
Pelargonidin-3- <i>O</i> -glucoside	61.3 \pm 0.7	93.0 \pm 0.8
Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside	64.4 \pm 0.9	NA
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	NA	NA
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	NA	NA
Gallic acid	NA	100.3 \pm 0.9
Protocatechuic acid	NA	NA
Syringic acid	NA	NA
Vanillic acid	NA	NA

* IC₅₀ is defined as the concentration required to achieve 50% inhibition in the binding of [³H]-estradiol to the corresponding estrogen receptor (ER). NA not achieve binding at the assayed concentration. IC₅₀ values are shown as mean \pm SD

measuring their ability to compete with 17- β -estradiol for the ER. Table 5 summarizes the IC₅₀ values obtained (concentration required to inhibit binding of [³H]-estradiol to the corresponding ER by 50%). Pelargonidin-3-glucoside showed affinity for both receptors, with a relatively higher affinity for ER α (61.3 μ M \pm 0.7) than for ER β (93.0 μ M \pm 0.8), whereas peonidin-3-glucoside only demonstrated affinity for ER α (64.4 μ M \pm 0.9) and delphinidin-3-glucoside only reasonable affinity for ER β (63.2 μ M \pm 0.8).

Among the phenolic acid metabolites assayed, gallic acid showed affinity for ER β (100.3 μ M \pm 0.9) but did not show affinity for ER α .

It is interesting to note that delphinidin-3-glucoside and gallic acid, with similar structural features in the hydroxylation pattern of their B-ring, showed affinity for ER β , but not for ER α . Moreover, delphinidin-3-glucoside demonstrated a binding affinity for ER β that is approximately twofold higher than that of gallic acid. These results are in accordance with those obtained in the molecular modeling studies and could be explained by the hypotheses that two

molecules of gallic acid are able to bind to the ER and display estrogenic/anti-estrogenic activities.

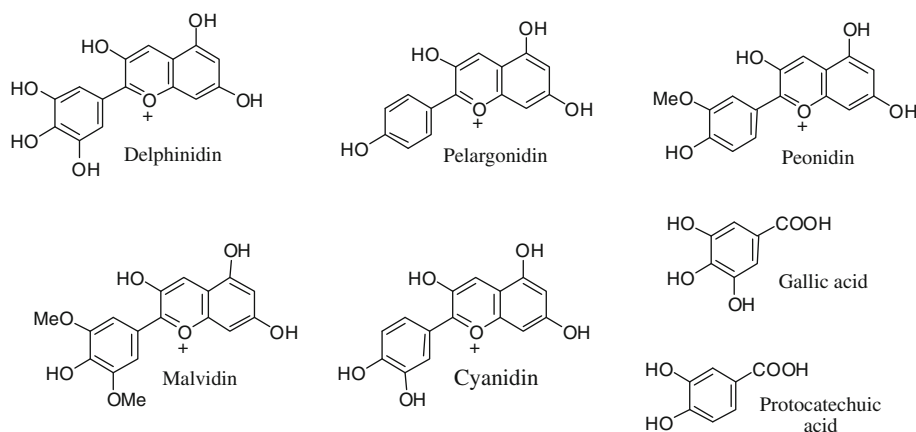
All other test compounds did not show any affinity for the ER at the concentrations tested.

Schmitt and Stopper (2001) have reported that anthocyanidins (the aglycones of anthocyanins) have high affinity toward ER α . They showed that pelargonidin (6.8 μ M) had the highest affinity among the assayed anthocyanidins followed by delphinidin (10.4 μ M) and cyanidin (12.2 μ M) (Cornwell et al. 2004). In a similar way, Chalopin et al. (2010) showed that the endothelium-dependent vasorelaxation of delphinidin and a red wine extract is mediated via ER α . With respect to ER α , the presence of up to 2-OH groups in the B-ring of the molecular structure decreased the affinity of the anthocyanins to the ER α (Fang et al. 2001). In contrast, delphinidin-3-glucoside and gallic acid with 3-OH groups demonstrated the highest affinity for ER β in our study.

Study of the binding mode on ER β and ER α : docking studies

We carried out docking studies for the anthocyanidins listed in Table 5 (delphinidin, pelargonidin, peonidin, malvidin, and cyanidin) and their metabolites (gallic and protocatechuic acids; see Fig. 1 for chemical structures) in the ligand-binding domains (LBD) of both ER α and ER β . In general, docking predictions were in agreement with affinity data.

Taking genistein (binding mode) as a reference, our purpose was to study whether the docking protocol was able to predict both the binding poses for anthocyanidins and any binding preference that could suggest selectivity. Regarding the binding poses, the most favorable poses corresponded to docked orientations where hydrogen bonds between hydroxyl groups and His524 (ER β His475) and Arg394-Glu353 (ER β Arg346-Glu305) are the main interactions, anchoring the ligand within the LBD of ER.

Fig. 1 Chemical structure of the main anthocyanidins and the phenolic metabolites assayed

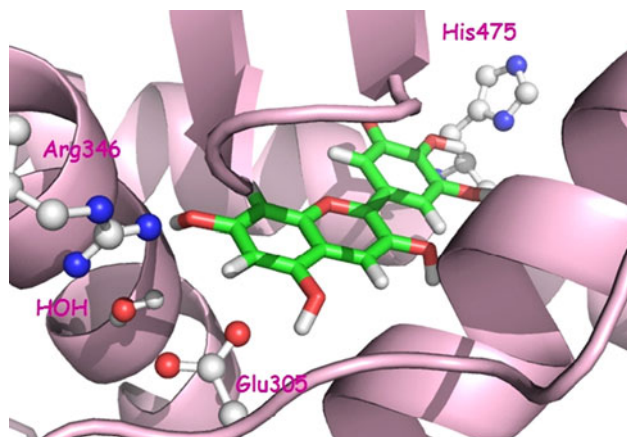


Fig. 2 ER β residues, highlighted alongside docked delphinidin, viewed from the front of the binding pocket

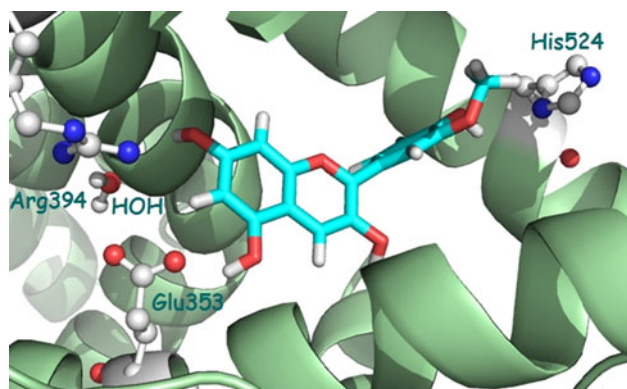


Fig. 3 Docking pose obtained for peonidin inside ER α -binding site. ER α residues in the ligand binding domain are highlighted

These interactions are crucial to give rise to a stable ligand-receptor complex that could account for the observed affinity. Regarding selectivity, no solutions were predicted for delphinidin by AutoDock when docked to ER α , while favorable binding orientations were found in ER β (Fig. 2). On the contrary, in the case of peonidin, only favorable poses were located in ER α (Fig. 3). These results are in agreement with the experimental affinity values (Table 5), which show ER β selectivity for delphinidin and ER α selectivity for peonidin. Our results are also in agreement with previous reports (Schmitt and Stopper 2001). As mentioned above, it should be pointed out that delphinidin has 3-OH groups in the B-ring. However, for pelargonidin, similar binding results were predicted without meaningful differences. Also, affinity assays only exhibited a slight preference toward ER α .

No binding poses were found for malvidin and cyanidin, in agreement with the absence of affinity, suggesting that these compounds are not suitable ER ligands.

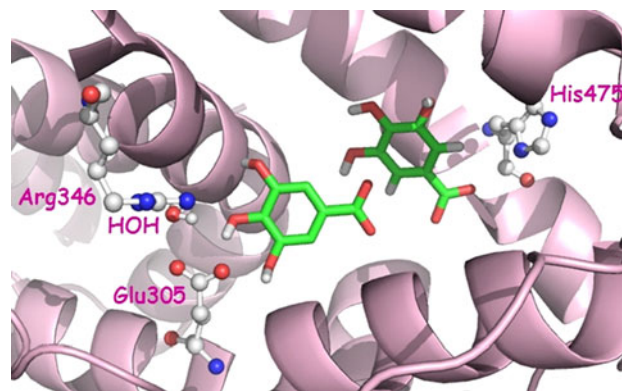


Fig. 4 Model of two docked molecules of gallic acid inside the ER β ligand-binding domain: hydrogen bonds between hydroxyl groups and His475 and Arg346-Glu305 are shown

In the case of phenolic acids, which are smaller molecules, all showed ability to bind to different regions of the LBD. Our computational efforts were then directed toward the study of the putative binding of two molecules within the LBD. AutoDock predicted that two units of both phenolic acids are able to interact simultaneously with the LBD, by adopting several orientations. Thus, we found that this hypothesis was possible from a theoretical perspective, since binding poses were found to reproduce the main interactions present in large ligands, justifying the anti-proliferative effect shown in the MCF-7 cell model: hydrogen bonds between hydroxyl groups and His524 (ER β His475) and Arg394-Glu353 (ER β Arg346-Glu305) (Fig. 4). From the study of interactions and predicted binding energies, it can be concluded that gallic acid binds with higher affinity to both ERs, compared with protocatechuic acid. Regarding selectivity, similar binding energy values were predicted for both ER α /ER β receptors. With these theoretical results, selectivity cannot be sighted.

Our results suggest that gallic acid could potentially be considered as an enterophytoestrogen; a gut microflora-derived metabolite that can exhibit higher estrogenic/anti-estrogenic activity than its corresponding precursor.

Nevertheless, the fact that these polyphenols demonstrate affinity for the estrogen receptors and display agonist/antagonist effects may suggest that these compounds could act in target genes and in tissues where they could collaborate in the health-promoting properties of anthocyanins.

Concluding remark

The mechanisms underlying the antiatherogenic effect of anthocyanins consumption is probably multifactorial. Our study suggests that the protective health effects of anthocyanins might not only be due to anthocyanins themselves,

but also to their metabolites produced by the action of the gut microflora. Both anthocyanins and their phenolic acid metabolites might play a role in decreasing vascular inflammatory markers, such as cytokines and adhesion and chemoattractant molecules. Despite observing a slight modulation of NO production by protocatechuic acid, the concentrations required to produce this effect do not fit with this being a potential mechanism of action for the antiatherogenic properties of anthocyanins. It might be the ability of anthocyanins and three of their metabolites to inhibit ACE activity, which could decrease the expression of inflammatory markers and therefore improve endothelial function. On the other hand, some of the assayed metabolites have shown a relatively important affinity for ER α and β , which regulate transcription of target genes, such as NF- κ B. This affinity could also be implicated in atheromatosis. Overall, the concentrations of anthocyanins and their metabolites, as used in the present cell culture and in vitro assays mediating anti-inflammatory, anti-adhesive, anti-estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities were often manifold higher than those physiologically achievable (Vitaglione et al. 2007). Further research, preferably in vivo, is necessary to determine whether, and to what extent, anthocyanin metabolites play a role in the prevention of atherosclerosis in humans.

Acknowledgments This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through projects AGL2006-05453, AGL2008-01713, AGL2009-07894, SAF2008-00945, and the Consolidator-Ingenio 2010 Programme (FUN-C-FOOD, CSD2007-00063). M. Hidalgo wishes to thank CSIC, for a JAE predoctoral fellowship (JAEPre094).

References

- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Fraga CG (2006) Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem* 54:229–234
- Avila M, Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, Pelaez C, Requena T, de Pascual-Teresa S (2009) Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Res Int* 42:1453–1461
- Badia E, Sacanella E, Fernandez-Solá J, Nicolás JM et al (2004) Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cell after moderate alcohol consumption. *Am J Clin Nutr* 80:225–230
- Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, Bustos C et al (2000) Red wine intake prevents nuclear factor- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 102:1020–1026
- Caccetta RA, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB (2000) Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr* 71:67–74
- Cassidy A, de Pascual-Teresa S, Rimbach G (2003) Molecular mechanisms by which dietary isoflavones potentially prevent atherosclerosis. *Expert Rev Mol* 30:1–15
- Chalopin M, Tesse A, Martínez MC, Rognan D, Arnal JF, Andrian-tsitohaina R (2010) Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium. *PLoS One* 5:e8554
- Chen JC, Ho FM, Chao P-DL, Chen C-P et al (2005) Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor- κ B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur J Pharmacol* 521:9–20
- Chun OK, Chung SJ, Song WO (2007) Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 37:1244–1252
- Cornwell T, Cohick W, Raskin I (2004) Dietary phytoestrogen and health. *Rev Phytochem* 65:995–1016
- Dang ZC, Lowit C (2005) Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrinol Metab* 16:207–213
- Estruch R (2000) Wine and cardiovascular disease. *Food Res Int* 33:219–226
- Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antúnez E et al (2004) Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized cross-over trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis* 175:117–123
- Fang H, Tong W, Leming MS, Blair R et al (2001) Structure-activity relationships for large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol* 14:280–294
- Forester SC, Waterhouse AL (2008) Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *J Agric Food Chem* 56:9299–9304
- Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem* 43:890–894
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE et al (2004) Gaussian 03, revision C.02. Gaussian Inc., Wallingford
- Fuchs D, Erhard P, Turner R, Rimbach G, Daniel H, Wenzel U (2005) Genistein reverses changes of the proteome induced by oxidized-LDL in EA.hy 926 human endothelial cells. *J Proteome Res* 4:369–376
- García-Alonso M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC, de Pascual-Teresa S (2004) Antioxidant and cellular activity of anthocyanidins and their corresponding vitisins A—studies in platelets, monocytes and human endothelial cells. *J Agric Food Chem* 52:3378–3384
- García-Alonso M, Minihane AM, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC, de Pascual-Teresa S (2009) Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *J Nutr Biochem* 20:521–529
- García-Saura MF, Galisteo M, Villar IC, Bermejo A et al (2005) Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem* 270:147–155
- González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ (2010) Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr* 104:S15–S27
- Gray JI, DeWitt DL (1999) Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyaniding, from tart cherries. *J Nat Prod* 62:294–296
- Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A et al (2000) Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. *Ann Intern Med* 133:411–419
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E (1999) Anti-Inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Med Inflamm* 2007:1–10

- Kahkonen MP, Heinonen M (2003) Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem* 51:628–633
- Keppler K, Humpf HU (2005) Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem* 13:5195–5205
- Kinoshita E, Yamakoshi J, Kikuchi M (1993) Purification and identification of an angiotensin converting enzyme from soy sauce. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1107–1110
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM et al (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113:71S–88S
- Kwon HM, Choi YJ, Jeong YJ, Kang SW et al (2005) Anti-inflammatory inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by flavone derivatives. *J Agric Food Chem* 53:5150–5157
- Lacaille-Dubois MA, Franck U, Wagner H (2001) Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine* 8:47–52
- Landberg R, Sun Q, Rimm EB, Cassidy A et al (2011) Selected dietary flavonoids are associated with markers of inflammation and endothelial dysfunction in U.S. women^{1,2}. *J Nutr* 141:618–625
- Long LH, Hoi A, Halliwell B (2010) Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Arch Biochem Biophys* 501:162–169
- Lotito SB, Frei BD (2006) Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor α -induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 281:37102–37110
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81:230–242
- Matsumoto H, Nakamura Y, Hirayama M, Yoshiki Y, Okubo K (2002) Antioxidant activity of black currant anthocyanin aglycons and their glycosides measured by chemiluminescence in a neutral pH region and in human plasma. *J Agric Food Chem* 50:5034–5037
- McCann MJ, Gill CI, McGlynn H, Rowland IR (2005) Role of the mammalian lignans in the prevention and treatment of prostate cancer. *Nutr Cancer* 52:1–14
- Morigiwa A, Kitabatake K, Fujimoto Y, Ikekawa N (1986) Angiotensin converting enzyme inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull* 34:3025–3028
- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R et al (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. *J Comput Chem* 19:1639–1662
- Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS (2004) Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells. *Toxicol Sci* 80:14–25
- Naruszewicz M, Laniewska I, Millo B, Dluzniewski M (2007) Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infarction (MI). *Atherosclerosis* 194:179–184
- Orlicek SL, Meals E, English BK (1996) Differential effects of tyrosine kinase inhibitors on tumor necrosis factor and nitric oxide production by murine macrophages. *J Infect Dis* 174:638–642
- Park YC, Rimbach G, Saliou C, Valacchi G, Packer L (2000) Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF- κ B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett* 465:93–97
- Pérez-Jiménez J, Fezeu L, Touvier M, Amault N et al (2011) Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr* 93:1–9
- Persson IA, Persson K, Andersson RG (2009) Effect of *Vaccinium myrtillus* and its polyphenols on angiotensin-converting enzyme activity in human endothelial cells. *J Agric Food Chem* 57:4626–4629
- Quirós A, Ramos M, Muguerza B, Delgado MA et al (2007) Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int Dairy J* 17:33–41
- Ricketts M-L, Moore DD, Banz WJ, Mezei O, Shay NF (2005) Molecular mechanism of action of the soy isoflavonas includes activation of promiscuous nuclear receptor. *Rev J Nutr Biochem* 16:321–330
- Rimbach G, Valacchi G, Canali R, Virgili F (2000) Macrophages stimulated with INF- γ activate NF- κ B and induce MCP-1 gene expression in primary human endothelial cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 3:238–242
- Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE (2003) Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res* 48:601–606
- Sacanella E, Vázquez-Agell M, Mena MP, Antúnez E et al (2007) Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 86:1463–1469
- Schmitt E, Stopper H (2001) Estrogenic activity of naturally occurring anthocyanidins. *Nutr Cancer* 41:145–149
- Sentandreu MA, Toldrá F (2006) A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chem* 97:546–554
- Shahzad S, Bitsch I (1998) Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Chromatogr B Biomed Sci* 705:87–95
- Shahzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I (2001) Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr* 131:1207–1210
- Tamir S, Tannenbaum SR (1996) The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1288:F31–F36
- Terra X, Valls J, Vitrac X et al (2007) Grape-seed procyanidins act as anti-inflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 Macrophages by inhibiting NF κ B signaling pathway. *J Agric Food Chem* 55:4357–4365
- Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S et al (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-D-glucoside and cyanidin. *J Agric Food Chem* 42:2407–2410
- Tsuda T, Shiga K, Ohshima K, Kawakishi S, Osawa T (1996) Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem Pharma* 52:1033–1039
- Valacchi G, Rimbach G, Saliou C, Weber SU, Packer L (2001) Effect of benzoyl peroxide on antioxidant status, NF- κ B activity and interleukin- α gene expression in human keratinocytes. *Toxicology* 165:225–234
- Vallance P, Leiper J (2002) Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 1:939–950
- Virgili F, Marino M (2008) Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 45:1205–1216
- Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F et al (2007) Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr* 137:2043–2048
- Wagner H, Elbl G (1992) ACE-inhibitory procyanidins from *Lespedeza capitata*. *Planta Med* 58:297
- Wang J, Mazza G (2002a) Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- α -activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 50:850–857

- Wang J, Mazza G (2002b) Quantification of nitrite in the presence of anthocyanins using Griess and GC/MS assays. *J Food Biochem* 26:339–354
- Wang H, Cao G, Prior RL (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem* 45:304–309
- Wille PR, Ribeiro-do-Valle RM, Simoes CM, Gabilan NH, Nicolau M (2001) Effect of quercetin on tachykinin-induced plasma extravasation in rat urinary bladder. *Phytother Res* 15:444–446
- Wu XL, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB et al (2006) Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem* 54:4069–4075
- Yan J-J, Jung J-S, Hong Y-J, Moon YS et al (2004) Protective effect of protocatechuic acid isopropyl ester against murine models of sepsis: inhibition of TNF- α and nitric oxide production and augmentation of IL-10. *Biol Pharmacol Bull* 27:2024–2027

ARTÍCULO 4

**“METABOLISM OF ANTHOCYANINS BY HUMAN GUT
MICROFLORA AND THEIR INFLUENCE ON GUT BACTERIAL
GROWTH”**

Journal of Agricultural and Food Chemistry (60 (2012) 3882-3890)

Metabolism of Anthocyanins by Human Gut Microflora and Their Influence on Gut Bacterial Growth

Maria Hidalgo,[†] M. Jose Oruna-Concha,[‡] Sofia Kolida,[‡] Gemma E. Walton,[‡] Stamatina Kallithraka,[§] Jeremy P. E. Spencer,[‡] Glenn R. Gibson,[‡] and Sonia de Pascual-Teresa^{*,†}

[†]Department of Metabolism and Nutrition, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

[‡]Department of Food and Nutritional Sciences, School of Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading, Reading RG6 6AP, U.K.

[§]Wine Institute of Athens, S. Venizelou 1, 14123, Likovrisi, Athens, Greece

ABSTRACT: Consumption of anthocyanins has been related with beneficial health effects. However, bioavailability studies have shown low concentration of anthocyanins in plasma and urine. In this study, we have investigated the bacterial-dependent metabolism of malvidin-3-glucoside, gallic acid and a mixture of anthocyanins using a pH-controlled, stirred, batch-culture fermentation system reflective of the distal human large intestine conditions. Most anthocyanins have disappeared after 5 h incubation while gallic acid remained constant through the first 5 h and was almost completely degraded following 24 h of fermentation. Incubation of malvidin-3-glucoside with fecal bacteria mainly resulted in the formation of syringic acid, while the mixture of anthocyanins resulted in formation of gallic, syringic and *p*-coumaric acids. All the anthocyanins tested enhanced significantly the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus*–*Enterococcus* spp. These results suggest that anthocyanins and their metabolites may exert a positive modulation of the intestinal bacterial population.

KEYWORDS: anthocyanins, microbial metabolism, phenolic acids, gut microbiota, prebiotics

■ INTRODUCTION

Anthocyanins are a subgroup of flavonoids that contribute to the blue, purple and red color in many fruits and vegetables. Naturally they are polyhydroxy or polymethoxy derivatives of 2-phenylbenzopyrylium often with a sugar moiety attached to the aglycon (anthocyanidins). Most frequent in nature are the glycosides of cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, and petunidin. The daily intake of anthocyanins in humans has been estimated to be between 3 and 215 mg/day;^{1,2} more recent studies suggest an average consumption on the order of 57–69 mg/day.^{3,4} Gallic acid, on the other hand, is a polyphenol that is ubiquitous in fruits and vegetables. It is a trihydroxybenzoic acid which exists in nature in its free form but can also be found forming hydrolyzable tannins. More recently it has been described as being a metabolite or degradation product deriving from different flavonoids. Gallic acid daily intake in humans has been estimated to be 12 mg/day.³

The bioavailability of the intact anthocyanin is a fundamental factor for their physiological functions. Anthocyanins are rapidly absorbed through the stomach and small intestine by different mechanisms that may involve specific enzymes such as bilitranslocases.^{5,6} However most studies have shown very low bioavailability of anthocyanins including the original anthocyanins and their conjugated metabolites, glucuronidated and sulfated.⁷

Since only a small part of dietary anthocyanins are absorbed, large amounts of the ingested compounds are likely to enter the colon. In vitro studies have shown deglycosylation and degradation of monoglucosides and diglucosides of anthocya-

nins due to the activity of colonic microbiota.^{8,9} Keppler et al., 2005,⁹ reported that cyanidin-3-rutinoside was first transformed by gut microbiota into the corresponding glucoside and then converted to phenolic acids which can be further metabolized by the gut microbiota. The anthocyanin nucleus is broken down and protocatechuic acid is detected as a product of the human colonic bacteria. Also metabolism of the methoxyl derivatives was accompanied by O-demethylation. More recently, it has been shown that malvidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside are metabolized by intestinal microbiota due to β -glucosidase activity.^{10,11}

The large intestine is by far the most colonized region of the digestive tract, with a total population of 10^{11} – 10^{12} CFU/mL of contents with more than 500 bacterial species, of which over 99% are anaerobic.¹² Through the process of fermentation, gut bacteria are able to produce a wide range of compounds that have both positive and negative effects on gut physiology as well as other systemic influences. The balance among human gut microbiota has been linked to both beneficial and harmful effects in the host. Putatively beneficial bacteria such as *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. are genera which include bacteria that have been observed to contribute to human health at different levels. They have been shown to enhance the gut barrier function, stimulate the host immune system, prevent diarrhea or allergies, participate in the

Received: January 18, 2012

Revised: March 14, 2012

Accepted: March 23, 2012

Published: March 23, 2012

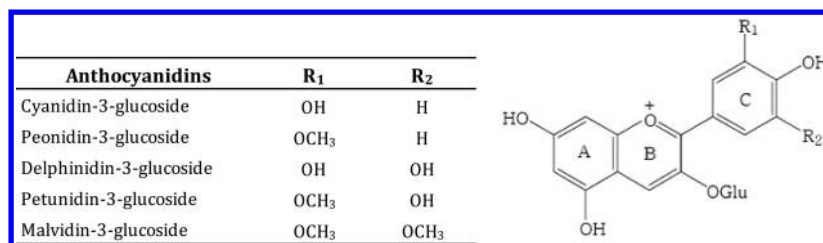


Figure 1. Structure of the main anthocyanidins.

activation of provitamins, and modulate the lipid metabolism.^{13–16} However, there are other bacterial species associated with negative implications, such as *Clostridium difficile*, which has been associated with inflammatory bowel disease.¹⁷

In this study, we have investigated the potential of anthocyanins and gallic acid to influence the growth of specific bacterial groups in a pH-controlled, stirred, batch-culture fermentation system that is reflective of the environmental conditions located in the distal region of the human large intestine. We have also investigated the differential metabolism of all the mentioned compounds in this competitive bacterial environment and show if they are capable of inducing positive changes in the balance of bacterial groups.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Plant material (grape aqueous extract) obtained as a byproduct of a wine-making industry was kindly provided by Bodegas Osborne and Bodega Capilla del Fraile (Toledo, Spain).

Unless otherwise stated, all chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich Co. Ltd. (Poole, Dorset, U.K., or Madrid, Spain) or Fisher Scientific (Loughborough, Leics, U.K., or Madrid, Spain).

Bacteriological growth medium supplements were obtained from Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hants, U.K.). Enocianin (E-163), a *Vitis vinifera* grape peel anthocyanidin-rich extract, was kindly supplied by Sensient Food Colors Italy (Reggio Emilia, Italy). Enocianin is a commercial food coloring that contains malvidin-3-glucoside (200 mg/L and 20 mg/L respectively), delphinidin-3-glucoside (60 mg/L and 6 mg/L respectively), petunidin-3-glucoside (85 mg/L and 8.5 mg/L respectively), peonidin-3-glucoside (traces), and cyaniding-3-glucoside (traces) (see Figure 1 for structures).

Raftilose P95 FOS was purchased from Orafiti (Tienen, Belgium). Anthocyanins used to obtain the calibration curves were purchased by Extrasynthese (Lyon, France).

All the nucleotide probes used for fluorescent *in situ* hybridization (FISH) were commercially synthesized and labeled with the fluorescent dye Cy3 at the 5' end (Sigma Aldrich Co. Ltd., Spain).

Sterilization of media and instruments was done by autoclaving at 121 °C for 15 min.

Extraction, Purification, and Isolation of Malvidin-3-Glucoside. In order to isolate the anthocyanin malvidin-3-glucoside, byproduct from the wine industry was used. The aqueous extract was filtered and washed with *n*-hexane, the remaining solvent was removed under vacuum, and the residue was lyophilized. Malvidin-3-glucoside was isolated using a semipreparative RP-HPLC (Waters, Milford, USA) equipped with a double pump system Delta 600 and connected to a 996 photodiode array detector, a 717 plus autosampler injector, and a fraction collector II (Waters). The lyophilized extract (10 g) was diluted with 100 mL of water, filtered through a 0.45 μm filter, and passed through a column Nova Pack HR C18, 4 μm, 300 × 7.8 mm (Waters). Solvents used were aqueous 4.5% formic acid (A) and HPLC-grade acetonitrile (B) at a flow rate of 4 mL/min. Starting with 10% B the gradient was the following: from 10% B to 15% B in 2 min, from 15% to 20% B in 4 min, from 20% to 25% B in 9 min, and isocratically 25% B for 2 min. Detection was carried out at 520 nm. After addition of water, chromatographic solvents were removed under vacuum and the compound was lyophilized and stored at –20 °C.

The purity and identity of malvidin-3-glucoside were checked by HPLC using a diode array detector (HPLC-DAD).

Fecal Sample Preparation. Fecal samples were collected from three separate individuals. All volunteers were in good health and had not ingested antibiotics for at least 6 months before the study. Samples were collected, on site, on the day of the experiment and were used immediately. The samples were diluted 1:10 (w/v) with anaerobic phosphate buffered saline (0.1 M; pH 7.4) and homogenized in a stomacher for 2 min (460 paddle beats/min). Resulting fecal slurries from each individual were used to inoculate the batch-culture vessels.

Batch-Culture Fermentation. Batch-culture fermentation vessels (100 mL volume: one vessel per treatment group) were sterilized and filled with 54 mL of basal nutrient medium (peptone water (2 g/L), yeast extract (2 g/L), NaCl (0.1 g/L), K₂HPO₄ (0.04 g/L), KH₂PO₄ (0.04 g/L), NaHCO₃ (2 g/L), MgSO₄·7H₂O (0.01 g/L), CaCl₂·6H₂O (0.01 g/L), Tween 80 (2 mL/L), hemein (50 mg/L), vitamin K1 (10 mL/L), L-cysteine (0.5 g/L), bile salts (0.5 g/L), resazurin (1 mg/L), and distilled water). The pH of the basal medium was adjusted to 7 and autoclaved before dispensing into vessels. Medium was then gassed overnight with O₂-free N₂ (15 mL/min). Before addition of the fecal slurries, the temperature of the basal nutrient medium was set to 37 °C by using a circulating water bath and the pH was maintained at 6.8 using a pH controller (Electrolab, U.K.). The vessels were inoculated with 6 mL of fecal slurry (1:10, w/v), and in order to mimic conditions located in the distal region of the human large intestine the experiment was run under anaerobic conditions, 37 °C and pH 6.8–7.0 for a period of 24 h. During this period, samples (4 or 3 mL) were collected at four time points (0, 5, 10, and 24 h) for FISH, and at seven time points (0, 1, 2, 4, 5, 10, and 24 h) for anthocyanins and metabolite analysis by HPLC. Before FISH analysis, duplicate samples were fixed for a minimum of 4 h at 4 °C with 4% (w/v) filtered paraformaldehyde. For anthocyanin analysis, aliquots (500 μL) were dispensed into eppendorf tubes containing 500 μL of HCl (0.1% v/v) in methanol and centrifuged at 13000g for 10 min. The supernatant fraction was removed and stored at –80 °C. The remaining sample was dispensed (1 mL in duplicate) into eppendorf tubes containing 30 μL of phosphoric acid in water 1:1 (v/v) and centrifuged at 13000g for 10 min. The supernatant fraction was removed and stored at –80 °C until analysis.

Inoculation of Substrate in the Batch Culture. Gallic acid (150 mg/L and 1000 mg/L), malvidin-3-glucoside (20 mg/L and 200 mg/L), and enocianin (4850 mg/L and 48500 mg/L) were inoculated in stirring batch-culture vessels (one per treatment) containing fecal slurry (1%). These amounts were estimated to reflect lower and upper levels of malvidin-3-glucoside and gallic acid intake. The higher and lower amounts of enocianin contain the higher (200 mg/L) and lower (20 mg/L) amounts of malvidin-3-glucoside used in our experimental conditions.

The prebiotic FOS (1%, w/v) (Raftilose P95) was included as control in the experiment. Fermentations with no added substrate were also included. All the experiments were carried out in the dark to avoid anthocyanin degradation.

Bacterial Enumeration. In order to assess the changes in bacterial populations fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was used with oligonucleotide probes designed to target specific diagnostic regions of 16S rRNA. The probes were commercially synthesized and labeled with the fluorescent dye Cy3. The bacterial groups studied for enumeration were EUB338/II/III, for the total number of bacteria;¹⁸

Bif 164, specific for *Bifidobacterium* spp.;¹⁹ Lab 158, for *Lactobacillus-Enterococcus* spp.;²⁰ Erec 482, for the *Clostridium coccooides-Eubacterium rectale* group;²¹ Chis 150, for the *C. histolyticum* group;²¹ Bac 303, for *Bacteroides* spp.;²² and Ato 291, for *Atopobium-Coriobacterium* group.²³ Probe sequences and hybrid-

Table 1. Fish Oligonucleotide Probes Used in This Study

probe name	target bacterial group/species	sequence from 5' to 3' end	T_H (°C)	refs
Ato 291	<i>Atopobium</i> spp.	GGT CCGT CT CT CAACCC	50	23
Bac 303	<i>Bacteroides</i> spp.	CCAAT GT GGGGGACCT T	46	22
Bif 164	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CAT CCGGCAT TACCACCC	50	19
Chis 150	<i>C. histolyticum</i> group	TT AT GCGGT AT TAATCT YCCT TT	50	21
Erec 482	<i>Eubacterium rectale-Clostridium coccooides</i> group	GCT TCTT AGTCARGTACCG	50	21
Lab 158	<i>Lactobacillus-Enterococcus</i> spp.	GGT AT TAGCAYCT GTT T CCA	50	20
EUB338	total bacteria	GCT GCCT CCCGT AGGAGT	46	18
EUB338II	total bacteria	GCAGCCACCCGT AGGTGT	46	18
EUB338III	total bacteria	GCT GCCACCCGT AGGTGT	46	18

ization conditions are listed in Table 1. Batch culture supernatant samples (375 μ L) fixed in 1.125 μ L of 4% (w/v) filtered paraformaldehyde overnight at 4 °C were then centrifuged at 13000g for 5 min, washed twice with PBS (0.1 M; pH 7.0), resuspended in 300 μ L of PBS–99% ethanol mixture (1:1, v/v), and stored at –20 °C for at least 1 h. Hybridization of cell suspensions was performed with the use of the modified well method described by Daims et al., 2005.²⁴ Briefly, the cell suspension was diluted appropriately for each probe and 20 μ L was pipetted onto each well of a Teflon- and poly-L-lysine-coated 6-well slide (Tekdon Inc., Myakka City, FL). Slides were dried in a desktop plate incubator for 15 min, dehydrated in ethanol (50%, 80%, and 96% (v/v) ethanol, 3 min each), and dried again. To increase cell permeability for the Lab158, Bif164, and Ato291 probes, samples were treated with 50 μ L of lysozyme solution (1 mg/mL in 100 mM Trizma HCl pH 8.0) at room temperature for 15 min before being washed in water and were finally dehydrated in the ethanol series (50%, 80%, and 96% (v/v) ethanol, 3 min each).

The hybridization mixture (50 ng/mL probe in hybridization buffer) was added onto the surface of each well, and slides were placed onto the slide tray, which was sealed and left for 4 h in the hybridization oven set at the appropriate temperature for each probe (Table 1). Once the hybridization was complete, slides were removed from the slide tray and transferred into 50 mL of wash buffer (warmed at the appropriate temperature for each probe) containing 20 μ L of 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 50 ng/mL; Sigma) for a further 15 min. Slides were then dipped into ice-cold distilled water for 2–3 s and dried with a stream of compressed air. Antifade solution (polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO antifading; Sigma) was then added to each well, and a coverslip was applied. Slides were stored in the dark at 4 °C (for a maximum of 3 days) until cells were counted under an epifluorescence microscope (Brunel Ltd., Wiltshire, U.K.). The DAPI-stained cells were examined under ultraviolet light, and hybridized cells were viewed with the use of a DM510 filter. For each slide, at least 15 random different fields of view were counted. The following equation was used to calculate the numbers of bacteria: $\log_{10} (C = N \times 0.8 \times 8702.47 \times 50q)$, where C is cell/mL of sample, N is the average count derived from 15 fields of view, 8702.47 is the magnification constant, 50 is used to work the value back to 1 mL at 20 μ L used on the slide, q is the dilution factor,

and 0.8 is the dilution factor for the FISH preparation step. Microbial counts were expressed as \log_{10} bacterial cells per mL of feces.

HPLC Analysis. Quantitative analysis of the disappearance of anthocyanin glycosides and gallic acid and the formation of anthocyanin metabolites was carried out using an Agilent 1200 series liquid chromatograph with a quaternary pump and a photodiode array detector. Samples were centrifuged (10000 rpm/5 min/4 °C), and the supernatants were filtered through a 0.45 μ m filter and autoinjected into the HPLC system. HPLC-DAS was performed using an Ultrabase C18 column (5 μ m; 4.6 mm \times 150 mm) which was set thermostatically at 25 °C. Solvents used to analyze disappearance of anthocyanins were aqueous 4.5% formic acid (A) and HPLC-grade acetonitrile (B) at a flow rate of 0.5 mL/min. Starting with 10% B, the gradient was the following: from 10% B to 20% B in 20 min, from 20% B to 25% B in 10 min, from 25% B to 35% B in 10 min, and isocratically 35% B in 10 min. Detection wavelengths were 280, 330, 370, and 520 nm. Anthocyanins were detected at 520 nm, and their peak areas were referred to calibration curves obtained with malvidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, and peonidin-3-glucoside. Limits of detection and quantification were calculated and were in every case below 0.1 μ g/mL.

Solvents used to quantitatively analyze other phenolic compounds were acetic acid 2.5% (A), HPLC-grade acetonitrile (B), ultrapure water (C), and acetic acid 2.5%/ HPLC-grade acetonitrile (90:10) (D) at a flow rate of 0.5 mL/min. Starting with 100% A, the gradient was the following: from 100% A to 100% D in 3 min, from 100% D to 1% B in 4 min, isocratically 1% B in 3 min, from 1% B to 15% B in 20 min, from 15% B to 60% B in 5 min, and isocratically 60% B in 5 min. Detection wavelengths were 280, 330, and 370 nm. Areas of gallic acid and other identified phenolic compounds were compared with calibration curves prepared with the corresponding standards, wherever possible. Limits of detection and quantification were calculated and were in every case below 0.5 μ g/mL.

HPLC–MS Analysis. In order to confirm the identity of the recorded anthocyanins and phenolic compounds and to detect other potential compounds that could not be detected with HPLC-DAS, additional analysis was performed by using HPLC with mass spectrometry detection. Mass spectrometry was performed using an Agilent 1100 series liquid chromatograph equipped with an API source and employing an ESI (electrospray ionization) interface. The HPLC system was connected to a photodiode array detector and a simple quadrupole G1946D Q-LC/MS. Sheath as well as auxiliary gas was a mixture of helium and nitrogen. The capillary voltage was 3 V and the capillary temperature 180 °C. Solvents used were ultrapure water (A), HPLC-grade acetonitrile (B), formic acid 1% (C), and formic acid 1%/HPLC-grade acetonitrile (90:10) (D) at a flow rate of 0.5 mL/min. Starting with 100% C, the gradient was the following: from 100% C to 100% D in 3 min, from 100% D to 1% B in 4 min, isocratically 1% B in 3 min, from 1% B to 12% B in 20 min, from 12% B to 50% B in 5 min, isocratically 50% B in 5 min, and from 50% B to 100% C in 2 min. The MS detector was programmed to perform a series of consecutive scans: full scan from m/z 150 to 1500 and in addition MS^2 , MS^3 , and MS^4 spectra from the most abundant ion were recorded. Spectra were recorded in the positive ion mode. Standards of anthocyanins and other phenolic compounds were also injected to help in the identifications.

Statistical Analysis. Malvidin-3-glucoside, enocianin, and gallic acid were tested in batch cultures inoculated with fecal samples collected from three individual donors in three separate experiments. The \log_{10} numbers of specific bacteria were expressed as mean values and standard deviations. Statistical tests were performed using the SPSS computer program, version 19.0 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA). One-way analysis of variance (ANOVA): post hoc multiple comparisons was carried out. Differences between control and tested samples were assessed on the basis of confidence intervals using the Tukey test. The level of significance was $p \leq 0.05^*$.

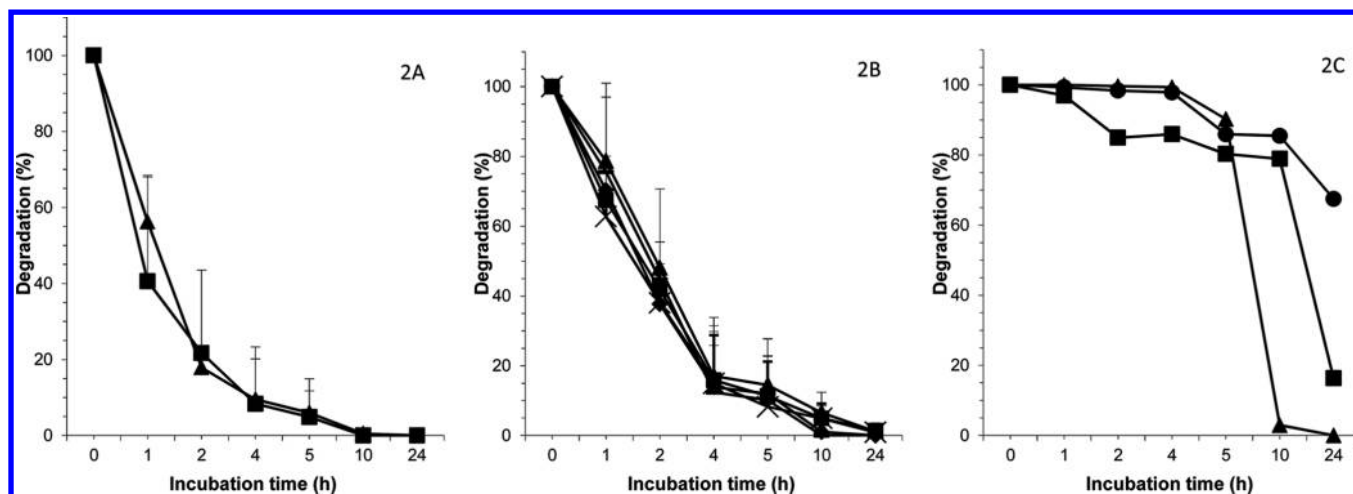


Figure 2. Percentage of degradation (y axes) of malvidin-3-glucoside (200 mg/L) (▲) and malvidin-3-glucoside (20 mg/L) (■) (A); enocianin 4850 mg/L: malvidin-3-glucoside (■), delphinidin-3-glucoside (▲), cyanidin-3-glucoside (rectangle), petunidin-3-glucoside (×), and peonidin-3-glucoside (◆) (B), and gallic acid 1000 mg/L tested with donor 1 (▲), donor 2 (●), and donor 3 (■) (C) in the presence of gut microflora. Data were derived from three independent experiments, and values are expressed as means \pm SD, except in panel C, where the three experiments are showed individually.

RESULTS AND DISCUSSION

Metabolism of Anthocyanins and Gallic Acid by Human Fecal Microbiota. In order to evaluate the metabolism of gallic acid, malvidin-3-glucoside, or the mixture of anthocyanins containing malvidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, and cyanidin-3-glucoside by human fecal microbiota, incubation media collected at 0, 1, 2, 4, 5, 10, and 24 h were analyzed using HPLC-DAD to identify and quantify the metabolites. Additionally, HPLC-MS was used to confirm phenolic products.

Anthocyanins and Gallic Acid Disappearance from the Fermentation Media. After 1 h of incubation, malvidin-3-glucoside incubated alone was greatly metabolized in the higher (44%) and lower (59%) concentrations, and almost completely metabolized after 4 h of incubation (Figure 2A). All anthocyanins contained in the mixture at lower concentration underwent a great metabolism (85%) within the first 4 h and were totally degraded following 24 h of fermentation (Figure 2B), with the exception of batch culture 3, where a small amount (1.23%) still remained at 24 h. In the mixture at high concentration, anthocyanins were greatly metabolized within 4 h (46%) and were almost completely degraded at 24 h, except in batch culture 3, where a residual amount (31%) of malvidin-3-glucoside was still present (data not shown). The fastest rate of degradation of malvidin-3-glucoside alone versus malvidin-3-glucoside mixed with other anthocyanins could be due to the complicated bacterial access to the matrix sample, and this could potentially reflect a more realistic approach of what may be happening *in vivo* in the human colon.

On the other hand, gallic acid concentration in the medium remained constant within the first 5 h of microbial fermentation with the highest rate of metabolism taking place between 5 and 24 h, after which it was almost completely degraded. Gallic acid, however, underwent a slower metabolism rate in batch 2, and approximately 50% of the initial concentration still remained at 24 h (Figure 2C).

Incubation of malvidin-3-glucoside without fecal microbial fermentation confirms chemical stability at pH 6.5 and 37 °C, probably due to the presence of glucose and the methoxylation pattern that lead to a high stability.¹⁰ However, chemical

degradation of delphinidin-3-glucoside demonstrated 60% of disappearance within the first 5 h of fermentation and was almost fully degraded by 24 h. The presence of 3 hydroxyl groups in the B-ring structure makes it susceptible to chemical degradation; moreover stability is affected by pH, temperature, light, and oxygen.

Appearance of Newly Formed Compounds after Anthocyanin and Gallic Acid Metabolism. Chemical breakdown of delphinidin leads to the formation of gallic acid and traces of homogentisic, syringic, and *p*-coumaric acids.¹⁰ Moreover, our results indicate that the degradation of malvidin-3-glucoside is entirely due to specific bacterial-dependent metabolism; in contrast delphinidin-3-glucoside reduction is unspecific bacterial-independent degradation.

No aglycons were found for any of the anthocyanin glycosides used under any of the collection times assayed. Anthocyanin glycosides must have been hydrolyzed by enzymes of fecal microbiota by cleavage of the 3-glycosidic linkage; the released aglycons formed transiently could have been degraded into the corresponding phenolic acids emanating from B ring since aglycons are very unstable under physiological conditions in the intestine at neutral pH. However, Keppler and Humpf, 2005,⁹ detected small amounts $<10 \mu\text{M}$ of aglycons after 2 h of incubation with pig gut microbiota. Our data appear to suggest that the formation of imine may have occurred as a result of the high reactivity of aldehydes with free NH_2 groups of amino acids or proteins.

Anthocyanin recovery from fecal slurries was calculated to be 85%, 60%, and 90% respectively for malvidin-3-glucoside, the mixture of anthocyanins, and gallic acid respectively. It is possible that the losses are due to the attachment to the fecal slurry of the different anthocyanins. This last could clarify why low amounts of primary phenolic products appear in 0 h samples with malvidin-3-glucoside alone or mixed with other anthocyanins. The main primary phenolic degradation product detected in incubation with malvidin-3-glucoside was syringic acid ($t_R = 19.2$). The highest amounts of syringic acid were observed after 4 h of incubation (Figure 3), and after that the amount decreased gradually in parallel to the rate of degradation of malvidin-3-glucoside (Figure 2A). The metab-

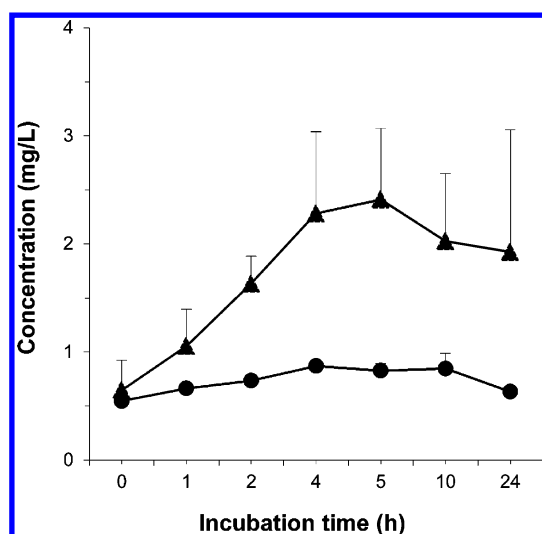


Figure 3. Formation of syringic acid from malvidin-3-glucoside (200 mg/L) (▲) and malvidin-3-glucoside (20 mg/L) (●) in the presence of gut microflora. Data were derived from three independent experiments, and values are expressed as means \pm SD.

olism of malvidin-3-glucoside also transiently provided high amounts of gallic acid ($t_R = 7.6$) and pyrogallol ($t_R = 7.1$). Syringic acid might have suffered enzymatic demethylation of C3 and C5 of the B-ring, which degenerated into gallic acid, even reaching a higher amount than syringic acid. The fact that pyrogallol was found in the sample indicates further metabolism such as decarboxylation of the first metabolite, gallic acid.

As Table 2 indicates, more peaks were detected in the HPLC profile following incubation with malvidin-3-glucoside (Figure

Table 2. Chromatographic and Spectral Characteristics of Anthocyanin Metabolites Produced by Gut Microbiota

peak	name	t_R (min)	λ_{max} (nm)	molecular ion M^+
1	unknown	4.2	298	125
2	unknown	4.7	278	123
3	unknown	6.5	274	139
4	pyrogallol	7.1	264	127
5	gallic acid	7.7	272	171
6	unknown	10.5	270	123
7	unknown	18.5	322	371
8	syringic acid	19.3	272	199
9	<i>p</i> -coumaric acid	25.6	308	165

4). However, taking into account the features and the corresponding spectrum, it is possible to assume that these peaks could belong to benzoic acids following further metabolism, since hydroxylated aromatic compounds are formed from the A-ring. Some authors have also identified hydroxylated and nonhydroxylated benzoic and phenylacetic derivatives from other flavonoids.^{25–28}

With respect to anthocyanin mixtures, as expected, mainly formation of gallic, syringic, and *p*-coumaric acids took place. As shown in Figure 5, a great amount of gallic acid was detected at low sample concentrations, reaching the maximum concentration at 4–5 h, a time where anthocyanins were extensively degraded. Both chemical and microbiologic degradation of delphinidin-3-glucoside seem to be responsible for the formation of their corresponding phenolic acids. Besides

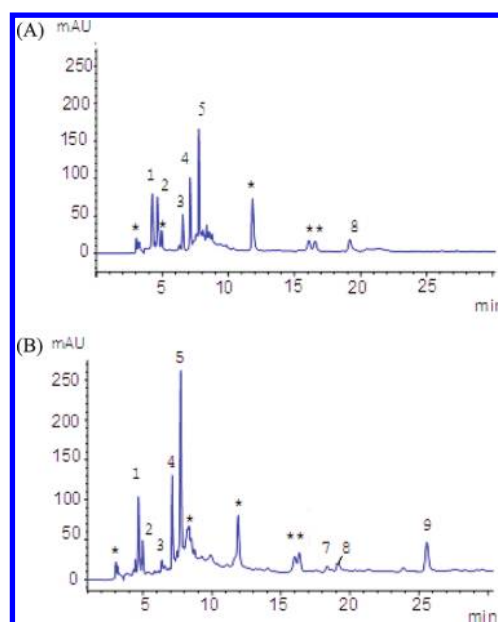


Figure 4. HPLC chromatograms recorded at 280 nm corresponding to malvidin-3-glucoside (200 mg/L) at 4 h (A) and enocianin (4850 mg/L) at 5 h (B). Peak identities are detailed in Table 2. The asterisks represent the peaks that also appear in the control without substrate.

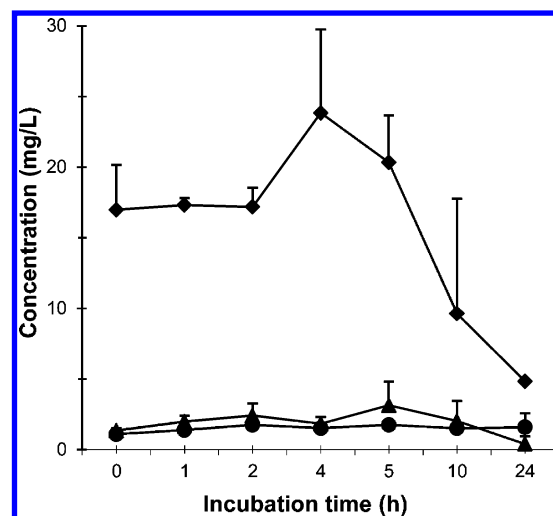


Figure 5. Formation of gallic (◆), syringic (●), and *p*-coumaric acid (▲) from enocianin (4850 mg/L) in the presence of gut microflora. Data were derived from three independent experiments and values are expressed as means \pm SD.

simultaneous deglycosylations of malvidin-3-glucoside, enzymatic reactions must have taken place to transform gallic acid whereas the metabolism of anthocyanins might have contributed toward the formation of syringic and *p*-coumaric acid.

The addition of excess substrate in the experiments with high concentration of anthocyanins appeared to preserve them from bacterial metabolism, in fact we only detected syringic and *p*-coumaric acid with the second donor and gallic and *p*-coumaric acids with the third donor.

According to other studies,^{9,29} incubation of gut microflora with malvidin-3-glucoside led to the formation of syringic acid as the main degradation product. Regarding the degradation of delphinidin-3-glucoside, gallic acid was also formed, however, in a previous study where delphinidin-3-glucoside was incubated

with pig gut microbiota, gallic acid was not found, indicating that this phenolic acid could have been metabolized.³⁰ Fleschhut et al.²⁹ identified vanillic and protocatechuic acids as the major degradation products of peonidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside, respectively, after incubation with human feces. In our study, we might not have detected these degradation products due to the initial low amount of both anthocyanins in the sample.

On the other hand, gallic acid is rather stable against further metabolism by human gut microbiota. We observed the formation of pyrogallol following 10 h fecal fermentation with the first donor in both concentrations whereas with the second and third donors it was detected following 24 h of fermentation. Furthermore, we noticed that the appearance of pyrogallol at 10 h took place with donor 1 where gallic acid was degraded more rapidly.

The rate of degradation and transformation of the tested compounds differed in batch cultures inoculated with samples of different fecal donors. Therefore, we could conclude that the individual composition of intestinal microbiota contributes to the bioavailability and bioefficacy of phenolic compounds in the systemic circulation. Consequently, the colon may be considered as an active site of metabolism in which bacteria contribute to the health effects of phenolic compounds.

In general, glycosylated anthocyanins were rapidly degraded by the fecal microbiota, and more rapidly following incubation of individual ones such as malvidin-3-glucoside. However, the disappearance of anthocyanins during the incubation did not correspond with the amount of phenolic acids formed. Hence, other reactions might contribute to anthocyanin disappearance. The flavylium form of anthocyanins is reversible at neutral pH and could be transformed into the quinoidal anhydrobase, which may react with different groups in several macromolecules.

Our results suggest that anthocyanins, such as malvidin-3-glucoside, which are poorly absorbed after ingestion, enter the colon and are fermented by the intestinal microbiota to produce anthocyanin metabolites which might be responsible for observed health effects in vivo.³¹ In terms of biological activity, the microbial metabolism could improve the health-giving properties. Previous studies have reported that gallic acid exerts antioxidant activity against oxidative stress, and in vitro studies have confirmed that gallic acid exhibits antiadhesive, antiproliferative, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities.³² With regard to syringic acid, studies carried out by Stanikunaite et al., 2009,³³ showed that it displays a strong antioxidant activity as well as an inhibitory COX-2 activity in mouse macrophages (RAW 264.7). In addition, phenolic acids such as *p*-coumaric are observed to exert anti-inflammatory activity in human colonic fibroblasts.³⁴ However, some health effects of microbial metabolites do not require their absorption through the gut barrier and therefore they may have a direct impact on the gut mucosa and protect it against oxidative stress or the action of carcinogens.³⁵

Anthocyanins and Gallic Acid-Induced Changes in Specific Bacterial Groups. In order to evaluate the changes in bacterial populations in response to malvidin-3-glucoside, enocianin, and gallic acid, we used FISH analysis. This method has been previously used in in vitro and in vivo studies to assess potential prebiotic effects of different substrates.^{37,51,52} FISH analyses were performed at 0 (control), 5, 10, and 24 h of incubation. Malvidin-3-glucoside enhanced the growth of total bacteria achieving a statistically significant increase at 24 h of

incubation when tested at high concentration (Figure 6A), compared with the total number measured in the control vessel

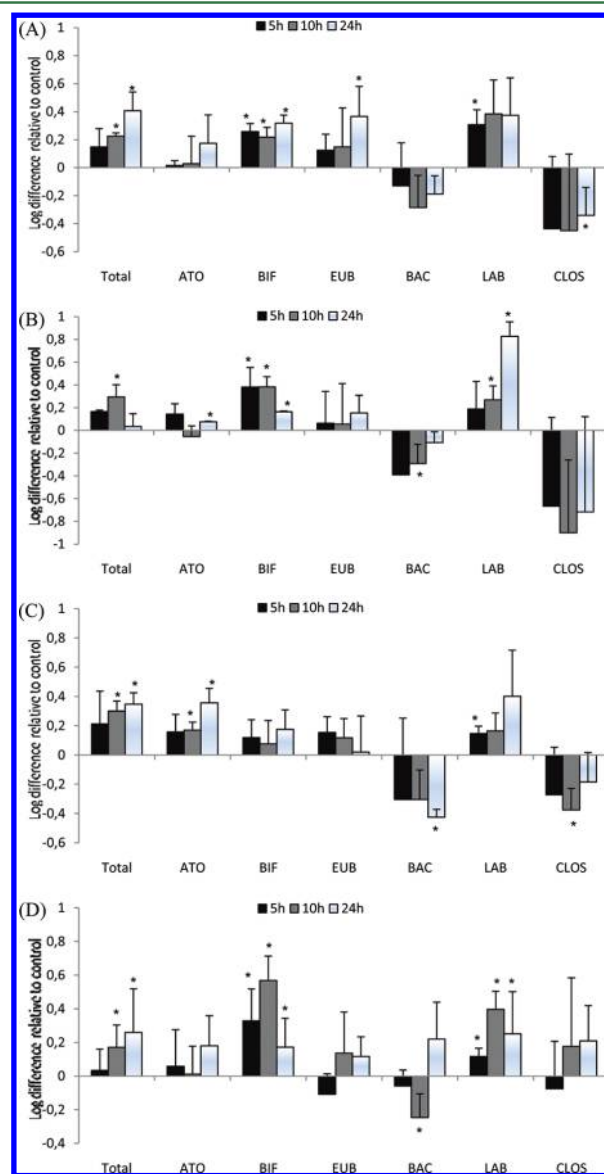


Figure 6. Influence of malvidin-3-glucoside (200 mg/L) (A), enocianin (4850 mg/L) (B), gallic acid (1000 mg/L) (C), and FOS (1%, w/v) (D) on the gut microflora in a pH-controlled fecal batch culture. Samples were collected at 0, 5, 10, and 24 h and analyzed by fluorescence in situ hybridization. ATO, *Atopobium* spp.; BIF, *Bifidobacterium* spp.; EUB, *C. coccoides*-*Eubacterium rectale* group; BAC, *Bacteroides* spp.; LAB, *Lactobacillus* spp.; CLOS, *Clostridium histolyticum* group. Changes in bacterial growth calculated by comparing the number of a specific bacterial group in the treatment with the number found in a control group, at the same time point. Values are mean ($n = 3$), with standard deviations represented by vertical bars. Mean value was significantly different from that of the control: * $p < 0.05$.

(log 8.99 ± 0.19). Furthermore, malvidin-3-glucoside caused a significant increase in the growth of bacteria associated with beneficial effects such as *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in relation to the control vessel at the same time points. With respect to *Bifidobacterium* spp., the highest concentration of malvidin-3-glucoside showed statistically significant increases at 5, 10, and 24 h (Figure 6A) compared with the total number

measured in controls at 5, 10, and 24 h ($\log 7.87 \pm 0.13$, 7.87 ± 0.10 and 7.76 ± 0.18 respectively). A tendency to an increase was shown in the growth of the microbial group of *C. coccoides*–*Eubacterium rectale* at 24 h—a group associated with butyrate production. A decrease, although not significant, in the potentially detrimental *C. histolyticum* group was observed following 24 h fermentation. No significant effect in the growth of *Bacteroides* spp. measured in vessels supplemented with malvidin-3-glucoside was shown. Therefore overall a selective shift in the microbial community was observed that could offer potential benefits to the host.

The addition of high concentration level of mixed anthocyanins to the vessels rendered the microbial cells impossible to count, therefore only data from vessels supplemented with low concentration of enocianin is presented.

The vessels supplemented with the mixture of anthocyanins at low concentration caused a marked significant increase in the growth of *Bifidobacterium* spp. following 5, 10, and 24 h fermentation, reaching a higher growth than in the presence of malvidin-3-glucoside. Moreover, the noticeable growth of *Lactobacillus* spp. observed in the presence of blended anthocyanins was statistically significant following 5, 10, and 24 h fermentation (controls for 5, 10, and 24 h were $\log 7.34 \pm 0.15$, 7.21 ± 0.22 , and 7.09 ± 0.35 respectively). Furthermore, anthocyanin exposure resulted in greater growth stimulation of *Lactobacillus* spp. than the positive control FOS, a well-known commercial prebiotic. The total bacterial number in media treated with anthocyanins increased significantly in relation to the control after 10 h of fermentation ($\log 9.05 \pm 0.05$). However, there was no significant change in *C. coccoides*–*Eubacterium rectale* group or *C. histolyticum* group.

In addition, we tested one of the most important metabolites of anthocyanins, gallic acid. In general, gallic acid reduced the growth of a group that includes some potentially harmful bacterial *C. histolyticum* group without negative effect on beneficial bacteria tested (Figure 6C). Both concentrations of gallic acid reduced consistently the growth of *C. histolyticum* group. It was significantly reduced at 10 h in high concentrations and at 10 and 24 h in low concentrations, moreover it significantly inhibited the growth of *Bacteroides* spp. at 10 and 24 h in high concentration tested and at 24 h in the low concentration (control values at 10 and 24 h were $\log 8.44 \pm 0.12$ and 8.25 ± 0.06 respectively). Additionally, gallic acid significantly enhanced the growth of the total bacterial number and *Atopobium* spp. following 24 h fermentation ($\log 7.75 \pm 0.10$ for the control) (Figure 6C).

The significant changes in bacterial composition in response to the rapid metabolism to malvidin-3-glucoside is especially marked with the higher amount, however when we added the lower amount of malvidin-3-glucoside mixed with other anthocyanins, we found a synergistic effect with respect to the enhancement of growth of the beneficial bacterial group comparing with both concentrations of individual malvidin-3-glucoside supplementation. In contrast, the significant changes in bacterial composition in response to gallic acid are similar in both concentrations. Its later degradation and the differences obtained in the rate of metabolism among different donors could be responsible for this effect.

Current evidence supports the concept that oral administration of probiotic therapies may be beneficial in gastrointestinal tract disorders. Probiotics have been defined as a live microbial ingredient the beneficial effects of which in the

gastrointestinal tract, including enhancement of gut barrier function, regulation of immune system, improving atopic diseases, diarrhea or vaginal infections, are well-known.³⁶ The selectively stimulating growth or activity of one or a limited number of beneficial bacteria in the colon is triggered by prebiotics. Both inulin and FOS have been already demonstrated to be effective prebiotics.³⁷ Our data show that when anthocyanins are fermented and the metabolites are available in the large bowel, modulation of the composition of the bacterial population is observed, especially in *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. The rapid metabolism of anthocyanins occurred over the first 4 to 5 h in all fermentation experiments, and it was not surprising since major groups of intestinal bacteria possess β -glucosidase activity, including *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. These bacteria possess the ability to metabolize phenolic compounds during growth supplying energy to cells and enriching the medium for bacterial growth with the release of glucose. Therefore, anthocyanins, particularly the grape derived mixture of anthocyanins, might act as growth-stimulator of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. which are associated with beneficial effects in the large intestine including the antimicrobial effect of pathogenic microorganisms by production of short chain fatty acids, as well as by competition for growth substrate and adhesion sites.³⁸ Increasing the numbers of lactic acid bacteria in the colon has been found to reduce the formation of procarcinogens in the large intestine³⁹ and to reduce the pH value. Moreover, the short chain fatty acids generated by these bacteria are linked to an inhibition of preneoplastic proliferation, conversion of cholesterol into bile acids, and modulation of the expression of multiple genes involved in the atherosclerosis process.^{17,40,41} In addition, malvidin-3-glucoside showed a tendency to promote the growth of *C. coccoides*–*Eubacterium rectale*, a group of bacteria known to produce large amounts of butyrate, for which anti-inflammatory and antineoplastic properties have been demonstrated in vitro, potentially benefiting inflammatory bowel disease and colorectal cancer sufferers.^{42,43} In contrast, the blend of anthocyanins containing malvidin-3-glucoside did not achieve an effect in the growth of this bacterial group. We also found that *Atopobium* spp. increased after supplementation with anthocyanins as well as with gallic acid. The role of *Atopobium* spp. in the human colon is not clear. Although they have been isolated from healthy human feces and increase after ingestion of the commercial prebiotic inulin, little is known about their effects. Some species can ferment glucose to organic acids as well as ferment peptides or amino acids. In a recent study, *Atopobium minutum* has been shown to induce apoptosis in colonic cancer cells and therefore suggest that this bacterium could act in a positive way.⁴⁴

Moreover we have found a marked decrease of *C. histolyticum*, a proteolytic bacterium, associated with tumor promoting properties and inflammatory bowel disease,^{13,45} when we supplemented the medium with gallic acid reaching significant inhibition at 10 and 24 h.

In previous studies, gallic acid as well as other benzoic acids and phenolic extracts exerted antimicrobial properties against pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, or *Salmonella enterica*^{46–49} without significantly affecting the growth of beneficial bacteria. In our study, interestingly gallic acid inhibited the growth of potentially negative bacteria without inhibiting any of the putatively beneficial bacteria tested. It is well-known that gallic acid is a good iron chelator

that forms stable complexes with these metal ions and hence decreases their availability to bacteria. Moreover, phenolic acids decrease the pH environment and form complexes with proteins or metal ions.

According to our results, studies in both humans and animals have revealed an increase in the growth of potentially beneficial bacteria such as *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., or the butyrate producing *C. coccoides*–*Eubacterium rectale* after administration of blackcurrant extract powder,⁵⁰ pomegranate extracts,⁵¹ or flavanol monomers.⁵² Moreover, polyphenols may act as antimicrobial compounds. Therefore, polyphenols such as the anthocyanins tested in this study may have potential health benefits via modulation of the gut microbiota.

In conclusion, despite the association between anthocyanin consumption and human health in a great number of epidemiological studies, their bioavailability is a key issue in their physiological function. It has been proved that anthocyanins can reach the colon in large amounts and thus gut microbiota might play a crucial role in their bioactivity.³¹ The present work provides new findings about the interaction between anthocyanins and gut microbiota which could act to explain the health effects observed after intake of anthocyanin-rich diets. Bacterial metabolism involves the cleavage of glycosidic linkages, breakdown of anthocyanidin heterocycle, and a further metabolism that can transform anthocyanins to smaller phenolic compounds in the colon. New metabolites like gallic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, and pyrogallol appeared after bacterial metabolism of anthocyanins, some of which have been described as being more bioactive than the native molecule. These observations suggest that anthocyanins may be potential nutrient sources for gut bacteria; moreover they and their metabolites may contribute to the maintenance of gastrointestinal health by exerting antioxidant activity in the large intestine and by modulating the gut microbial composition. Our data indicate that anthocyanins and their metabolites exert a potentially beneficial effect in the intestinal bacterial flora. However, future studies on the metabolism of anthocyanins and the role played in the potential prebiotic effect need to be performed *in vivo*.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +34 915492300. Fax: +34 915493627. E-mail: soniapt@ictan.csic.es.

Funding

This work has been financially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through Projects AGL2006-05453 and AGL2009-07894 and the Consolider-Ingenio 2010 Programme (FUN-C-FOOD, CSD2007-00063), a CSIC predoctoral fellowship to M.H. (JAEP094), and a CSIC Mobility Program fellowship to S.d.P.-T. (PA1002608).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- (1) Chun, O. K.; Chung, S. J.; Song, W. O. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J. Nutr.* **2007**, *37*, 1244–1252.
- (2) Kuhnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* **1976**, *24*, 117–191.
- (3) Pérez-Jiménez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P.; Scalbert, A. Dietary intake of 337

polyphenols in French adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *93* (6), 1220–1228.

- (4) Beking, K.; Vieira, A. An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2011**, *62*, 17–19.

- (5) Talavera, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Lamaison, J. L.; Remesy, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 4178–4182.

- (6) Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Vanzo, A.; Mattivi, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett.* **2003**, *544*, 210–213.

- (7) Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 230–242.

- (8) Aura, A. M.; Martín-López, P.; O'Leary, K. A.; Williamson, G.; Oksman-Caldentey, K. M.; Poutanen, K.; Santos-Buelga, C. *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J. Nutr.* **2005**, *44*, 133–142.

- (9) Keppler, K.; Humpf, H. U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5195–5205.

- (10) Ávila, M.; Hidalgo, M.; Sánchez-Moreno, C.; Pelaez, C.; Requena, M. T.; de Pascual-Teresa, S. Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1453–1461.

- (11) Selma, M. V.; Espín, J. C.; Tomás-Barberán, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6485–6501.

- (12) Macfarlane, S.; Macfarlane, G. T. In *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health*; Fuller, R., Perdigon, G., Eds.; Blackwell Publishing: Oxford, U.K., 2003; pp 24–51.

- (13) Gibson, G. R. Prebiotics as gut microflora management tools. *J. Clin. Gastroenterol.* **2008**, *42*, 75–79.

- (14) Hord, N. G. Eukaryotic-microbiota crosstalk: potential mechanisms for health benefits of prebiotics and probiotics. *Annu. Rev. Nutr.* **2008**, *28*, 215–231.

- (15) Tannock, G. W. Probiotics and prebiotics: Where are we going? In *Probiotics and prebiotics: Where are we going?* Tannock, G. W., Ed.; Caister Academic Press: Wymondham, 2002; pp 1–20.

- (16) Reddy, B. S. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1478–1482.

- (17) Rastall, R. A.; Gibson, G. R.; Gill, H. S.; Guarner, F.; Klaenhammer, T. R.; Pot, B.; Reid, G.; Rowland, I. R.; Sanders, M. E. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, *52*, 145–152.

- (18) Daims, H.; Brühl, A.; Amann, R.; Schleifer, K. H.; Wagner, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **1999**, *22*, 434–444.

- (19) Langendijk, P. S.; Schut, F.; Jansen, G. J.; Raangs, G. W.; Kamphuis, G. R.; Wilkinson, M. H. F.; Welling, G. W. Quantitative fluorescent *in situ* hybridisation of *Bifidobacterium* spp. with genus specific 16S rRNA targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3069–3075.

- (20) Harmsen, H. J. M.; Elfferich, P.; Schut, F.; Welling, G. W. A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent *in situ* hybridization. *Microb. Ecol. Health Dis.* **1999**, *11*, 3–12.

- (21) Franks, A. H.; Harmsen, H. J. M.; Raangs, G. C.; Jansen, G. J.; Schut, F.; Welling, G. W. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3336–3345.

- (22) Manz, W.; Amann, R.; Ludwig, W.; Vancanneyt, M.; Schleifer, K. H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-

flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **1996**, *142*, 1097–1106.

(23) Harmsen, H. J. M.; Wildeboer-Veloo, A. C. M.; Grijpstra, J.; Knol, J.; Degener, J. E.; Welling, G. W. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different ages. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 4523–4527.

(24) Daims, H.; Stoecker, K.; Wagner, M. Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of prokaryotes. In *Molecular Microbial Ecology*; Osborn, A. M., Smith, C. J., Eds.; Garland Science: Abingdon, U.K., 2005; Chapter 9, pp 213–239.

(25) Winter, J.; Moore, L.; H., Dowell, J. R.; Bokkenheuser, V. D. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 1203–1208.

(26) Dépriez, S.; Brezillon, C.; Rabot, S.; Philippe, C.; Mila, I.; Lapierre, C.; Scalbert, A. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by a human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2733–2738.

(27) Gonthier, M. P.; Cheynier, V.; Donovan, J. L.; Manach, C.; Morand, C.; Mila, I.; Lapierre, C.; Rémésy, C.; Scalbert, A. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 461–467.

(28) Van't Slot, G.; Humpf, H. U. Degradation and metabolism of catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and related compounds by the intestinal microbiota in the pig cecum model. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8041–8048.

(29) Fleschhut, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G.; Kulling, S. E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *Eur. J. Nutr.* **2006**, *45*, 7–18.

(30) Forester, S. C.; Waterhouse, A. L. Identification of cabernet sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9299–9304.

(31) Kahle, K.; Kraus, M.; Scheppach, W.; Ackermann, M.; Ridder, F.; Richling, E. Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 18–23.

(32) Hidalgo, M.; Martín-Santamaría, S.; de Pascual-Teresa, B.; Recio, I.; Sánchez-Moreno, C.; de Pascual-Teresa, S. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes Nutr.* **2011**, Ms. No. GENU-D-11-00075R1.

(33) Stanikunaite, R.; Khan, S. I.; Trappe, J. M.; Ross, S. A. Cyclooxygenase-2 inhibitory and antioxidant compounds from the truffle *Elaphomyces granulatus*. *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 575–578.

(34) Russell, W. R.; Drew, J. E.; Scobbie, L.; Duthie, G. G. Inhibition of cytokine-induced prostanoid biogenesis by phytochemicals in human colonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1762*, 124–130.

(35) Garsetti, M.; Pellegrini, N.; Baggio, C.; Brighenti, F. Antioxidant activity in human faeces. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, 705–710.

(36) Tuohy, K. M.; Probert, H. M.; Smejkal, C. W.; Gibson, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 692–700.

(37) Kolida, S.; Tuohy, K. M.; Gibson, G. R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* **2002**, *87*, 193–197.

(38) Gibson, G. R.; Wang, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **1994**, *77*, 412–420.

(39) Burns, A. J.; Rowland, I. R. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2000**, *1*, 13–24.

(40) Gibson, G. R.; Beaumont, A. An overview of human colonic bacteriology in health and diseases. In *Gut Flora and Health, past, present and future*; Leeds, A. R., Rowland, I. R., Eds.; The Royal Society of Medicine Press: London, 1996; pp 3–11.

(41) Ranganna, K. F.; Yatsu, F. M.; Hayes, B. E.; Milton, S. G.; Jayakumar, A. Butyrate inhibits proliferation-induced cell nuclear

antigen expression (PCNA) in rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **2000**, *102*, 910–918.

(42) Cavaglieri, C. R.; Nishiyama, A.; Fernandez, L. C.; Curi, R.; Miles, E. A.; Calder, P. C. Differential effects of short chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci.* **2003**, *73*, 1683–1690.

(43) Lupton, J. R. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 479–482.

(44) Altonsy, M. O.; Andrews, S. C.; Tuohy, K. M. Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by *Atopobium*, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: Mediation by the mitochondrial pathway. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *137*, 190–203.

(45) Hughes, R.; Magee, E. A. M.; Bingham, S. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2000**, *1*, 51–58.

(46) Lee, H. C.; Jenner, A. M.; Low, C. S.; Lee, Y. K. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* **2006**, *157*, 876–884.

(47) Puupponen-Pimia, R.; Nohynek, L.; Hartmann-Schmidlin, S.; Kahkonen, M.; Heinonen, M.; Maatta-Riihinen, K.; Oksman-Caldentey, K. M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *98*, 991–1000.

(48) Rodriguez-Vaquero, M. J.; Alberto, M. R.; Manca de Nadra, M. C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **2007**, *18*, 93–101.

(49) Nohynek, L. J.; Alakomi, H. L.; Kähkönen, M. P.; Heinonen, M.; Helander, I. M.; Oksman-Caldentey, K. M.; Puupponen-Pimiä, R. H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr. Cancer* **2006**, *54*, 18–32.

(50) Molan, A. L.; Liu, Z.; Kruger, M. The ability of blackcurrant extracts to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 1735–1743.

(51) Bialonska, D.; Ramnani, P.; Kasimsetty, S. G.; Muntha, K. R.; Gibson, G. R.; Ferreira, D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *140*, 175–182.

(52) Tzounis, X.; Vulevic, J.; Kuhnle, G. G. C.; George, T.; Leonczak, J.; Gibson, G. R.; Kwik-Urbe, C.; Spencer, J. P. E. Flavonol monomer-induced changes to the human faecal microbiota. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 782–792.

DISCUSIÓN
GENERAL

6 DISCUSIÓN GENERAL

La ECV es la primera causa de muerte a nivel mundial, tanto es así que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las muertes incrementarán de los 17 millones de 2008 a 25 millones en 2030²⁷⁸, por lo que se la empieza a calificar como epidemia.

La aterosclerosis y la trombosis están implicadas en la patogenia de la ECV y son las principales causas subyacentes de las manifestaciones clínicas. En general, las patologías asociadas al sistema vascular son originadas por estrés oxidativo y lesiones ateromatosas, caracterizadas por la acumulación de lípidos, células y tejido conectivo en la pared arterial unido a una inflamación vascular crónica.

Hay que resaltar que las ECVs suponen una gran carga para las economías de los países. Desgraciadamente, son diversos los factores de riesgo asociados a esta enfermedad. Algunos de estos factores, como la dieta, tienen un papel clave en las modificaciones de los procesos implicados en el desarrollo de la enfermedad, por lo cual, una estrategia alternativa podría centrarse en la población general a través de modificaciones en la alimentación como prevención a largo plazo.

Tras la descripción de la “paradoja francesa” (dieta rica en grasa saturada acompañada de una baja tasa de enfermedad coronaria) se despertó un gran interés por el papel que la ingesta rica en frutas y verduras pudiera tener en su explicación. Hasta la fecha, son muchas las investigaciones que asocian la disminución del riesgo cardiovascular con el consumo de antocianos²⁷⁹⁻²⁸¹ cuyos efectos potencialmente se relacionan con su habilidad para reducir la oxidación de lipoproteínas, mejorar el perfil lipídico y mitigar los efectos del estrés oxidativo e inflamación en el sistema vascular. Todos estos estudios ponen de manifiesto la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antiagregante que los alimentos ricos en antocianos ejercen en la aparición y desarrollo de la aterosclerosis²⁸². Sin embargo, tales efectos no pueden ser justificados sólo por los antocianos ya que los estudios de biodisponibilidad demuestran bajas concentraciones en plasma y en orina, pero altas en la entrada del colon. Por tanto, es necesario conocer cuáles son las moléculas y los mecanismos de acción implicados en estos efectos.

Así, el cometido de la presente Tesis Doctoral ha pretendido caracterizar los productos de degradación de los antocianos que llegan al colon como posibles responsables de su efecto saludable y elucidar los mecanismos moleculares por los

cuales los antocianos de la dieta y sus metabolitos interaccionan con algunas vías implicadas en la aterogénesis, ya sea, a nivel antioxidante o por vías de señalización inflamatoria.

I. Caracterización de los principales metabolitos de los antocianos generados por la acción de la flora intestinal, así como por degradación química

Con el fin de poner de manifiesto cuales son los compuestos potencialmente responsables de los efectos saludables en el organismo tras el consumo de antocianos, el **primer objetivo** consistió en determinar los metabolitos originados a partir de los principales antocianos que alcanzan el colon. Para ello, se utilizó un modelo que simulara la degradación química o espontánea, así como la degradación mediada por bacterias intestinales, previa determinación de su actividad β -glucosidasa.

En primer lugar, establecimos que una de las vías capaz de dar lugar a metabolitos de antocianos es la degradación química o espontánea. La malvidina-3-glucósido se mantuvo estable sin generar productos de degradación cuando se incubó sin bacterias a pH 6,5 y 37° C. Por el contrario, en las mismas condiciones, la delfinidina-3-glucósido sufrió una degradación del 60% a las 5 h y la desaparición total a las 24 h. La ruptura química del anillo B del esqueleto de delfinidina dio lugar a la formación de ácido gálico como metabolito mayoritario, además de trazas de ácidos homogentísico, siríngico y *p*-cumárico (**Artículo 1**).

Las diferencias encontradas en la degradación química de ambos antocianos parecen justificarse por sus estructuras químicas. A pesar de presentar una molécula de glucosa, que les confiere a ambos estabilidad, la delfinidina-3-glucósido presenta 3 hidroxilos en el anillo B que le hacen menos estable en condiciones desfavorables (pH, temperatura, luz, oxígeno) mientras que la malvidina-3-glucósido, con dos grupos metoxilo en su estructura, está protegida frente a la degradación. Así lo ratifica otro estudio en el cual los antocianos hidroxilados son rápidamente degradados durante las primeras 2 h, presentando el mayor ratio de degradación el antociano con mayor número de hidroxilos en el anillo B²⁸³.

A continuación, estudiamos la metabolización de malvidina-3-glucósido y delfinidina-3-glucósido originada por cepas puras de bacterias intestinales. Teniendo en cuenta la presencia de un enlace β -glucosídico en la estructura de estos antocianos y con

el fin de elucidar la ruptura del enlace como primer paso de la degradación bacteriana, comprobamos la actividad β -glucosidasa en ambos antocianos por parte de diversas cepas de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. lactis*. Los resultados obtenidos confirmaron la actividad β -glucosidasa en todas las cepas ensayadas tanto con concentrados de células como con extractos intracelulares. Los concentrados de células de *L. casei* y *L. plantarum* mostraron la mayor actividad ensayada, mientras que en el caso de *B. lactis* la actividad β -glucosidasa con extractos intracelulares fue muy superior al resto de cepas. Por el contrario, *L. acidophilus* demostró una baja actividad β -glucosidasa tanto con los concentrados como con los extractos (**Artículo 1**).

Con estos datos, el siguiente paso fue determinar el metabolismo de antocianos por incubación con cepas puras bacterianas. En todos los ensayos realizados (incluidos la degradación química y con muestras fecales) no encontramos aglicones (**Artículo 1 y 4**). Probablemente aquellos que pudieran formarse transitoriamente después de la ruptura del enlace β -glucosídico sufrieran posteriores transformaciones a sus correspondientes ácidos fenólicos provenientes del anillo B, ya que los aglicones son muy inestables a pH neutro como ocurre en el intestino. A diferencia de este resultado, Keppler *et al.*¹⁰⁸ encontraron una pequeña concentración de aglicones después de 2 h de incubación con bacterias intestinales de cerdo. Además, debido a pequeños aumentos del pH hacia valores más básicos durante la transformación de los aglicones, se puede formar la pseudobase carbinol que a la vez puede transformarse en calcona. Por este motivo, identificamos este compuesto en las muestras incubadas con malvidina-3-glucósido (**Artículo 1**).

Los antocianos incubados con concentrados de células sólo sufrieron un metabolismo parcial a las 24 h con ciertas cepas bacterianas. Por consiguiente, el análisis detallado del metabolismo de antocianos se realizó con extractos intracelulares de bacterias seleccionadas (*L. casei* LC-01, *L. plantarum* IFPL722, *L. acidophilus* LA-5 y *B. lactis* BB-12) (**Artículo 1**). Así, en la incubación de delphinidina-3-glucósido con los extractos intracelulares de *B. lactis* BB-12 observamos un intenso metabolismo que coincide con la alta actividad β -glucosidasa presentada por esta cepa. Como consecuencia de la rápida ruptura del anillo B del aglicón detectamos concentraciones muy superiores de ácido gálico a las encontradas en el control. Además, detectamos los ácidos homogentísico, siríngico, *p*-cumárico y sinápico. Igualmente, la incubación con *L. casei* LC-01 y *L. acidophilus* LA-5 dio lugar a la formación de los mencionados ácidos en valores superiores a los detectados por degradación química, lo cual indica la

implicación bacteriana en su metabolismo. Por otro lado, *L. plantarum* IFPL722 debe proteger al antociano de la degradación ya que encontramos concentraciones de delfinidina-3-glucósido muy superiores a las halladas en el control y como consecuencia sólo encontramos bajas cantidades de los ácidos. Es muy posible que la proteína presente en los extractos bacterianos sea la responsable de dicha protección. En el caso de la incubación con malvidina-3-glucósido no encontramos tal efecto, suponemos que por sus diferencias estructurales en el anillo B.

A diferencia de delfinidina-3-glucósido, la degradación bacteriana inicial de malvidina-3-glucósido resultó leve con todas las cepas utilizadas. Curiosamente, la alta actividad β -glucosidasa de *B. lactis* BB-12 no se correspondió con la desaparición de malvidina-3-glucósido. Aparte de la desglicosilación deben ocurrir otras reacciones enzimáticas de forma simultánea. No obstante, obtuvimos elevadas concentraciones de ácido gálico después de 5 h de incubación, así como de ácido sirínico y trazas de ácido homogentísico como consecuencia de posteriores degradaciones. También en la incubación con *L. plantarum* IFPL722 obtuvimos una importante concentración de los ácidos gálico y sirínico, así como una elevada concentración de ácido homogentísico y trazas de ácido sinápico a las 24 h. Igualmente, observamos importantes concentraciones de los ácidos gálico y sirínico incubando con *L. casei* LC-01, así como trazas de los ácidos homogentísico y propiónico a las 24 h. Por otro lado, la incubación con *L. acidophilus* LA-5 mantuvo al antociano intacto y por lo tanto no obtuvimos metabolitos. Con todas las cepas ensayadas se encontraron trazas de ácido *p*-cumárico al igual que con delfinidina-3-glucósido (**Artículo 1**).

Los diversos metabolitos formados a partir de malvidina-3-glucósido mediante incubación con cepas de *L. casei* LC-01, *L. plantarum* IFPL722, *L. acidophilus* LA-5 y *B. lactis* BB-12, indican un intenso metabolismo bacteriano. A diferencia de delfinidina-3-glucósido, la degradación de malvidina-3-glucósido es dependiente del metabolismo bacteriano y de las cepas presentes en el colon. No obstante, la degradación de delfinidina-3-glucósido se ve incrementada por las enzimas bacterianas.

El empleo de cepas puras de extractos intracelulares bacterianos reveló su implicación en el metabolismo de antocianos. Así pues, desarrollamos el siguiente ensayo con heces de voluntarios sanos para simular la llegada de antocianos al colon y cuya finalidad es conocer de forma detallada los metabolitos originados por la flora bacteriana con antocianos y ácido gálico, uno de los principales ácidos fenólicos resultantes del metabolismo de antocianos (**Artículo 4**).

En este sentido, observamos que malvidina-3-glucósido sufrió un intenso metabolismo llegando casi a desaparecer después de las 4 h. De igual manera, en la incubación con la mezcla de antocianos (malvidina-3-glucósido, delphinidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido) apreciamos también un intenso metabolismo durante las primeras 4 h y, en esta ocasión, su desaparición a las 24 h, exceptuando aquellos que se incubaron con la microbiota del tercer voluntario donde aún quedaban cantidades remanentes de todos los antocianos a las 24 h. En estos resultados se aprecia una degradación más rápida de la malvidina-3-glucósido incubada individualmente que aquella que proviene de la mezcla compleja de antocianos como consecuencia del difícil acceso de las bacterias a la matriz de compuestos, posiblemente como ocurre *in vivo* al ingerir antocianos con otros componentes de la dieta. De hecho, en este ensayo con malvidina-3-glucósido, el metabolismo es más activo que el ocurrido con extractos intracelulares bacterianos, lo que sugiere la actividad simultánea y sinérgica de varias cepas bacterianas (**Artículo 1 y Artículo 4**).

Por otro lado, el ácido gálico permaneció constante las primeras 5 h de incubación, llegando casi a desaparecer a las 24 h, excepto con la microbiota del segundo voluntario en la que un pequeño porcentaje permaneció sin degradarse.

El principal metabolito formado en la degradación de malvidina-3-glucósido es el ácido siríngico, cuya máxima concentración coincidió con la máxima degradación del antociano. Como consecuencia de las sucesivas transformaciones bacterianas del ácido siríngico, se formó el ácido gálico y el pirogalol. El ácido siríngico sufrió la desmetilación en C3 y C5 del anillo B para dar lugar a elevadas cantidades de ácido gálico, el cual se transformó en pirogalol por descarboxilación, de hecho, otros autores ya observaron esta capacidad descarboxilasa con cepas de *L. plantarum* en ácido gálico²⁸⁴. De acuerdo con otros estudios^{108, 111}, el ácido siríngico, proveniente del anillo B, es el principal metabolito de la malvidina-3-glucósido. Sin embargo, durante la incubación con extractos intracelulares bacterianos esto no ocurrió, probablemente porque sufriera transformaciones a gálico y homogentísico como sugiere otro estudio¹¹⁴. Además, observamos otros metabolitos cuya identificación no fue posible, pero sus características estructurales apuntan a que son ácidos benzoicos originados del intenso metabolismo del antociano. De hecho, otros autores han obtenido compuestos similares derivados del metabolismo de flavonoides^{138, 143, 285}.

En cuanto a los metabolitos generados por incubación de la mezcla antociánica observamos importantes cantidades de los ácidos gálico, siríngico y *p*-cumárico

provenientes de malvidina-3-glucósido y delphinidina-3-glucósido, además de los hipotéticos ácidos benzoicos. En concreto, la máxima concentración de ácido gálico se obtuvo cuando tuvo lugar la máxima degradación de antocianos. Anteriormente se describieron los ácidos vanílico y protocatéuico como metabolitos de peonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido, respectivamente¹¹¹, sin embargo, en este estudio no obtuvimos tales resultados como consecuencia de su baja concentración inicial en el extracto de partida, así como de su metabolismo, que pudo ser más intenso.

Respecto a los metabolitos obtenidos por degradación del ácido gálico, obtuvimos el pirogalol coincidiendo con la desaparición del ácido original y corroborando las reacciones de descarboxilación antes descritas.

Es importante resaltar los diferentes ratios de degradación encontrados como consecuencia de las diferencias interindividuales en la flora intestinal, por tanto la biodisponibilidad va a depender de este factor.

Estos datos ponen de manifiesto que el primer paso del metabolismo de antocianos implica la ruptura del enlace β -glucosídico seguido de posteriores transformaciones, tales como, ruptura del anillo, deshidroxilación y desmetilación aromática e hidrogenación, entre otras, para dar lugar a sus correspondientes ácidos fenólicos provenientes del anillo B, como los ácidos gálico y siríngico, y otros metabolitos derivados del anillo A. Tanto la actividad bacteriana como la degradación química estarían implicadas en el metabolismo descrito. De acuerdo con Aura *et al.*²⁸⁶, las transformaciones de polifenoles requieren de la actividad glucosidasa, así como desmetilación, deshidroxilación y descarboxilación. A pesar de esto, la desaparición de antocianos no se correspondió con la cantidad de ácidos fenólicos encontrados, lo que apunta a que deben existir otras reacciones; por ejemplo, a pH neutro la pseudobase flavilio es reversible y puede convertirse en una anhidrobase quinoidal, la cual puede reaccionar con grupos amino de las proteínas y no ser cuantificada. De hecho, son sobradamente conocidas las propiedades quelantes y de unión a proteínas que presenta el grupo catecol de la estructura del antociano²⁸⁷.

Por lo tanto, el catabolismo sufrido por antocianos en el colon origina una serie de moléculas de menor tamaño que sus precursores y que generalmente se absorben mejor en el intestino^{101, 102, 288}, además, sus posibles efectos beneficiosos deben ser tenidos en cuenta cuando se evalúan los efectos saludables de los antocianos. Es por ello que en este trabajo incluimos la realización de otros ensayos en los que se ponen de manifiesto las propiedades bioactivas por las que, tanto los antocianos como sus metabolitos,

ejercen funciones protectoras frente al desarrollo de aterosclerosis. De hecho, estudios previos han descrito ya la elevada actividad antioxidante del ácido gálico^{181, 289} o la actividad antiinflamatoria presentada por otros metabolitos de antocianos derivados de la microbiota del colon²⁹⁰.

II. Evaluación de la influencia de los antocianos en la modulación de la flora intestinal

Actualmente hay mucho interés en la modulación de la composición de la flora intestinal debido al importante papel que ésta ejerce en la salud del hospedador, por ello, las propiedades bioactivas que los antocianos puedan desempeñar en este sentido pueden estar implicadas en los efectos saludables encontrados *in vivo*. Así pues, en el **segundo objetivo** de este trabajo se evaluó la influencia de dichos compuestos en la modulación de la microbiota intestinal (**Artículo 4**).

Paralelamente a la fermentación microbiana en el colon, los antocianos no absorbidos y sus metabolitos pueden inhibir o estimular el crecimiento de ciertas especies bacterianas. Los datos obtenidos tras simular la fermentación en el colon con antocianos, indican un aumento de forma creciente de todas las bacterias, dato que no es de extrañar si tenemos en cuenta la liberación de glucosa al medio a consecuencia de la actividad β -glucosidasa. Cabe destacar el crecimiento significativo de *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., especialmente cuando la incubación tuvo lugar con la alta concentración de malvidina-3-glucósido. En este sentido, malvidina-3-glucósido mezclada con más antocianos a baja concentración provocó incluso un crecimiento más acusado de *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. indicando que no sólo es importante la concentración sino que su incremento está favorecido por un efecto sinérgico de varios antocianos. El hecho de que estas bacterias, principalmente fermentadoras de hidratos de carbono, sean las responsables del metabolismo de antocianos es positivo ya que ambas bacterias están asociadas a efectos saludables en el organismo debido a su actividad metabólica y a sus productos de la fermentación. Estos efectos hacen referencia a su capacidad para sintetizar vitaminas, modular el sistema inmune o inhibir el crecimiento de bacterias patógenas mediante competición por el sitio de unión o por nutrientes, disminución del pH o producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, ácido láctico, acético o ácidos grasos de cadena corta²⁹¹⁻²⁹⁴. En concreto, estos ácidos grasos de cadena corta contribuyen a inhibir la

proliferación del colonocito, reducen las concentraciones de colesterol en plasma y modulan la expresión de genes implicados en procesos ateroscleróticos²⁹⁵⁻²⁹⁸. Teniendo en cuenta que la disminución de colesterol en sangre previene su oxidación y que estas bacterias pueden inhibir las vías de señalización de receptores tipo Toll implicados en desencadenar la respuesta inflamatoria²⁹⁹, podríamos decir que estas bacterias son potencialmente clave en prevenir el inicio aterosclerótico. Adicionalmente, la incubación con malvidina-3-glucósido dio lugar a una tendencia al alza en el número de *C. coccoides-Eubacterium rectale*, grupo conocido por producir ciertas cantidades de ácido butírico cuyas propiedades antiinflamatorias y antineoplásicas han sido demostradas *in vitro*^{300, 301}. Respecto a bacterias potencialmente perjudiciales, observamos una ligera disminución en el número de *C. hystoliticum* con malvidina-3-glucósido, siendo esta disminución significativa en la incubación con ambas concentraciones de ácido gálico. Además, la presencia de ácido gálico en el medio inhibió el crecimiento de *Bacteroides* spp. Ambas disminuciones resultan relevantes en la salud del hospedador puesto que estas bacterias poseen enzimas asociadas a la fermentación proteolítica cuyo resultado es la producción de productos como tioles, aminas o indoles, todos ellos relacionados con el cáncer^{291, 302}. Además, *C. hystoliticum* está relacionado con la enfermedad inflamatoria intestinal. Como ya habían observado otros investigadores³⁰³, la disminución de bacterias perjudiciales producida por la presencia de ácido gálico no perjudica al resto de bacterias beneficiosas. En parte, debido a que los ácidos fenólicos pueden disminuir el pH que afecta a la supervivencia de bacterias patógenas sin que las bacterias lácticas se vean afectadas. Además, los polifenoles tienen afinidad por unirse a metales afectando a las bacterias sensibles a su presencia³⁰⁴.

Los efectos que pueda ocasionar el incremento experimentado por el género *Atopobium* spp. tras ser suplementado con el ácido gálico y los antocianos no están del todo claros, sin embargo, estas especies bacterianas son productoras de grandes cantidades de ácidos láctico y acético mediante la fermentación de glucosa, por lo que sus efectos pueden estar relacionados con la salud de forma positiva.

En general, es importante resaltar, que todos estos datos sugieren que los antocianos favorecen el crecimiento de bacterias beneficiosas coincidiendo con el rápido metabolismo microbiano. A continuación, el ácido gálico que se produce como consecuencia del metabolismo de los antocianos ejerce un efecto inhibitorio en bacterias patógenas, otorgando al hospedador efectos beneficiosos. De acuerdo con estudios

previos, los antocianos no absorbidos y sus metabolitos actúan a nivel local aumentando el ambiente antioxidante en la mucosa intestinal y protegiendo del estrés oxidativo y de la acción de carcinógenos³⁰⁵.

Aunque hasta el momento el efecto prebiótico es ampliamente reconocido en sólo 3 tipos de oligosacáridos, se ha visto que cantidades importantes de antocianos llegan al colon sirviendo de sustrato a la microflora colónica, cuya fermentación modula la composición intestinal. Coincidiendo con otras investigaciones^{267, 270, 271, 273, 306, 307} donde se muestra que los flavonoides estimulan el crecimiento de bacterias consideradas probióticos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mientras que no modifican o inhiben el crecimiento de las patógenas, los antocianos podrían utilizarse como ingredientes prebióticos en la formulación de alimentos funcionales³⁰⁸.

Por lo tanto, el metabolismo microbiano de los antocianos no sólo es importante en la producción de compuestos de menor tamaño y por lo tanto capaces de ser absorbidos, sino que la modulación simultánea de la flora intestinal otorga al hospedador una serie de efectos beneficiosos relacionados con efectos antioxidantes y antiinflamatorios a nivel local. En consecuencia, se podrían explicar parte de los efectos saludables encontrados en aquellas personas que consumen dietas ricas en antocianos.

III. Determinación de la interacción entre flavonoides y su influencia en la capacidad antioxidante

Entre las funciones bioactivas de los antocianos se encuentra su capacidad antioxidante, la cual contribuye a prevenir el estrés oxidativo en el organismo al favorecer el mantenimiento del equilibrio entre especies reactivas y compuestos antioxidantes. Tal como se ha comentado previamente, el consumo de ciertos compuestos presentes en la dieta, como son los flavonoides, está relacionado con una disminución en el desarrollo de la aterosclerosis. Muchos estudios han demostrado el poder antioxidante de antocianos y compuestos fenólicos de forma aislada^{188, 309}, presentando incluso los ácidos fenólicos resultantes de la degradación de antocianos una actividad antioxidante muy superior a la presentada por sus compuestos de origen⁷. Sin embargo, los antocianos están presentes en frutas y verduras, o incluso en el plasma, acompañados por otros fenoles con los que pueden interactuar afectando a su actividad antioxidante total. Así pues, con el **tercer objetivo** se pretendió elucidar las interacciones existentes entre los antocianos y otros flavonoides presentes en los

alimentos de la dieta para conocer el verdadero poder antioxidante que los alimentos ejercen después de ser consumidos. Para la correcta evaluación de la actividad antioxidante se utilizaron dos métodos por sus diferentes mecanismos de acción: FRAP (capacidad de reducción férrica) y DPPH (poder secuestrante de radicales).

Los resultados obtenidos con DPPH indican que en la mayoría de las combinaciones de dos flavonoides disminuye la capacidad antioxidante comparada con la capacidad antioxidante de los flavonoides individuales (**Artículo 2**).

Aisladamente, quercetina y miricetina con dos y tres hidroxilos en el anillo B, respectivamente mostraron la mayor capacidad antioxidante, mientras que kaempferol y pelargonidina-3-glucósido, con un hidroxilo, mostraron la menor capacidad antioxidante. Sin embargo, las combinaciones de kaempferol con miricetina, quercetina o quercetina-3-glucósido dieron como resultado de su interacción un incremento significativo de la actividad antioxidante del 20%. Este incremento no ocurrió con pelargonidina-3-glucósido probablemente debido a que kaempferol posee, además de un grupo hidroxilo en el anillo B, un doble enlace entre C2 y C3, así como la función 4-oxo en anillo C. Además, pelargonidina-3-glucósido posee un residuo de azúcar en C3 y un ion oxonio en anillo C.

Por otro lado, la combinación de cada antociano estudiado y quercetina-3-glucósido provocó una acusada disminución de la actividad antioxidante o efecto antagonista. Este dato revela que, a pesar del evidente poder antioxidante presentado tanto por antocianos como por el flavonol en muchas frutas, verduras y productos funcionales donde se encuentran ambos flavonoides, se está produciendo una interacción que disminuiría la actividad antioxidante total. Es muy posible que estas interacciones ocurran entre los hidrógenos de ambas moléculas y esto lleve a una menor disponibilidad de los hidroxilos en su capacidad para secuestrar al radical.

A diferencia del DPPH, los datos obtenidos con el método FRAP muestran en su mayoría un aumento de la capacidad antioxidante de las combinaciones entre flavonoides comparada con la capacidad antioxidante de los flavonoides individuales (**Artículo 2**).

En esta ocasión, la combinación de epicatequina y quercetina-3-glucósido mostró el mayor incremento de la actividad antioxidante. En general, las combinaciones entre quercetina o quercetina-3-glucósido y otro flavonoide, favorecieron la actividad antioxidante produciendo un efecto sinérgico. Comparando ambos flavonoles, hemos observado que, a pesar de que quercetina-3-glucósido tiene ocupado el grupo hidroxilo

en posición 3 del anillo C, los dos han presentado la misma capacidad antioxidante cuando interaccionan con otro flavonoide. Por otra parte encontramos un importante efecto antagonista entre la miricetina y quercetina, dos potentes antioxidantes aislados. Además, otros efectos antagonistas menos relevantes tuvieron lugar cuando un antociano metilado participaba en la interacción. De acuerdo con algunos autores¹⁸¹, la metilación no mejora la capacidad antioxidante del flavonoide, sin embargo, otros estudios han demostrado que los metoxilos contribuyen a una mayor capacidad antioxidante en alimentos como el vino¹⁹³.

Cabe destacar que las diferencias encontradas en la actividad antioxidante entre los flavonoides aislados y sus combinaciones con ambos métodos son consecuencia no sólo de la estructura del compuesto y su forma de interaccionar, sino también de la naturaleza del solvente y su polaridad. Además, el poder antioxidante en los métodos que miden la captación de radicales va a depender del radical y su mecanismo de acción. Este mecanismo estará influenciado por las características estructurales presentadas después de la interacción, tales como, la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B, el doble enlace en C2 y C3 en conjugación con la función 4-oxo, la presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5, y de restos glicosídicos y el número y la posición de los grupos metoxilo. Es decir, las nuevas características estructurales serían las responsables de ejercer los distintos mecanismos antioxidantes para ofrecer la capacidad antioxidante final.

Por lo tanto, los flavonoides presentes en alimentos u otro medio pueden interaccionar entre ellos y, de acuerdo con otros autores^{171, 197, 310}, producir efectos sinérgicos o antagónicos que dan lugar a la capacidad antioxidante global de la muestra en la que se encuentran³¹¹.

Como ya han sugerido otros autores³¹², una de las explicaciones para estos efectos sinérgicos y antagónicos puede ser el hecho de que algunos antioxidantes en combinación actúan regenerándose, ya sea el más fuerte al más débil o viceversa. Esto puede tener un significado sinérgico si el antioxidante más débil regenera al más fuerte o antagonista si ocurre lo contrario.

Teniendo en cuenta que la vitamina liposoluble E es la principal encargada de inhibir la oxidación de LDL en plasma, su reciclado mediante flavonoides es un factor positivo en la prevención de enfermedades asociadas a estrés oxidativo. De hecho, varias publicaciones confirman la hipótesis de la inhibición de la peroxidación lipídica por

reciclado flavonoide-radical, ya sea el reciclado entre flavonoides o entre un compuesto fenólico como el ácido gálico y otros tipos de antioxidantes^{196, 313}.

Considerando, por un lado, la disminución del estrés oxidativo en personas que consumen elevadas cantidades de antioxidantes y por el otro, que los antioxidantes naturales son mejor aceptados por los consumidores que los sintéticos, todos estos factores deberán ser tenidos en cuenta a la hora de formular suplementos antioxidantes o fortificar alimentos con el fin de alcanzar los mayores efectos antioxidantes en el organismo y como consecuencia prevenir el desarrollo de ECVs.

IV. Determinación de la capacidad antiinflamatoria ejercida por antocianos y sus metabolitos por su implicación en la prevención del desarrollo aterosclerótico, a través de la medida de citoquinas, moléculas de adhesión y quimioquinas en diferentes modelos celulares, así como por inhibición de la ECA

A pesar de estar ampliamente establecida la capacidad antioxidante de los antocianos, sus efectos beneficiosos no pueden explicarse sólo por sus propiedades antioxidantes ya que la enfermedad aterosclerótica es multicausal y están implicadas varias vías bioquímicas. Además, los metabolitos de estos antocianos deben contribuir al efecto encontrado en el organismo. Así pues, con el **cuarto objetivo** se intentaron describir otros de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la aterosclerosis por parte de antocianos y sus metabolitos.

Aunque algunos autores habían estudiado ya los efectos de los antocianos en relación con las consecuencias de la disfunción endotelial^{99, 188}, estos efectos han sido escasamente abordados para los metabolitos de antocianos.

Los macrófagos son las principales células inflamatorias involucradas en la formación del ateroma. Los resultados encontrados en este trabajo confirman que su activación por diversos estímulos, LPS e IFN- γ , lleva consigo, de forma sinérgica, la liberación de sustancias proinflamatorias como el TNF- α y el NO. El efecto inhibitor del NO, que únicamente mostró el ácido protocatéquico, resultó más efectivo administrando conjuntamente los ácidos fenólicos con los estimuladores que pretratando previamente con los ácidos. Mientras que el pretratamiento con ácido protocatéquico 50 μ M redujo la secreción de NO en torno a un 20% (21% estimuladas con LPS y 6% con LPS+IFN- γ), para el cotratamiento tan sólo fue necesario ácido protocatéquico 10 μ M

para conseguir aproximadamente la misma reducción (20% estimuladas con LPS y 29% con LPS+IFN- γ) lo que sugiere que la disminución de la secreción de NO producida en el cotratamiento fue fruto de una interacción directa en el medio o mediante el secuestro del NO, sin embargo, en el pretratamiento el mecanismo implicado estaría relacionado con una regulación de expresión génica (**Artículo 3**). Como ya habían mostrado otros autores²¹⁰, los flavonoides pueden regular la secreción de sustancias inflamatorias mediante la inhibición de la enzima iNOs y la expresión del ARNm, así como inhibiendo factores de transcripción (NF- κ B y STAT-1) involucrados en la expresión de genes inflamatorios.

Respecto a la secreción de la citoquina TNF- α , células pretratadas con el ácido protocatéquico mostraron una ligera inhibición, mientras que las cotratadas no produjeron inhibición posiblemente debido a los mecanismos antes descritos.

Otra investigación observó efectos similares con el éster isopropílico del ácido protocatéquico en ratones³¹⁴, sin embargo, aunque las concentraciones encontradas en plasma de los ácidos fenólicos son mayores a las de los antocianos, en ambos casos las concentraciones son del orden de nanomoles por litro (nmol/L) y éstas no alcanzan los valores ensayados en este estudio (μ mol/L). La ingesta de aproximadamente 1 ó 2 copas de vino (5 mL/Kg peso) da lugar a una baja cantidad en plasma de ácido protocatéquico en torno a 200 nmol/L³¹⁵, pero quizás porque el vino no sea el producto más rico en su precursor, cianidina.

El siguiente paso descrito del desarrollo del ateroma en el que pueden estar implicados los antocianos y ácidos fenólicos sería la inducción de moléculas de adhesión y quimiotácticas. Estudios epidemiológicos han observado la disminución de estos marcadores inflamatorios después de la ingesta de vino^{206, 316}. Este hecho coincide con el resultado obtenido en el que el ácido gálico (10-100 μ M) provocó una disminución dosis-dependiente de ICAM-1, VCAM-1 y MCP-1 en células endoteliales estimuladas con la citoquina TNF- α . Aunque, a diferencia de otro estudio³¹⁷, no hemos encontrado tal efecto con ácidos protocatéquico, siríngico o vanílico (**Artículo 3**).

Se puede establecer por tanto una relación directa entre los ácidos fenólicos y la reducción del inicio del ateroma puesto que inhiben vías inflamatorias que tienen lugar en cascada. Es decir, se inhibe la secreción de un potente oxidante, el NO, así como de la citoquina que induce tanto la síntesis de este prooxidante como de las moléculas responsables del reclutamiento y la infiltración de monocitos a la íntima, evitando, por

tanto, la formación de células esponjosas en la íntima responsable de la placa de ateroma.

La activación de factores de transcripción como NF- κ B es en parte responsable de la transcripción de ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, NO y TNF- α . La presencia de LDLox o la generación de radicales libres de oxígeno pueden activar dicho factor mediante la degradación de proteínas inhibitorias I κ B.

Durante los eventos cardiovasculares, la Ang II está implicada en la formación de radicales libres y la expresión de NADPH oxidasa en células endoteliales y músculo liso vascular. El O₂⁻ generado unido a la sobreproducción de NO van a dar lugar a un aumento del estrés oxidativo y de las LDLox. Si consideramos que la Ang II es causante de estrés oxidativo, se podría considerar que los antocianos y ácidos fenólicos que bloquean a este péptido mediante la inhibición de la ECA podrían actuar previniendo el daño vascular. De manera que, a través de la inhibición de la ECA se evita que la Ang II, vía receptores AT₁, active el NF- κ B y provoque la translocación que origina un círculo cerrado que perpetúa los procesos inflamatorios antes descritos. Así, nuestros resultados indican que tanto los antocianos como los ácidos fenólicos (propiónico, siríngico, vanílico, sinápico, homogentísico, hidroxibenzoico, floroglucinol, cafeico, gálico y *p*-cumárico) actúan a este nivel. Parece ser que los más activos son los antocianos seguidos de los ácidos cafeico, gálico y *p*-cumárico (**Artículo 3**). Estos datos sugieren que la presencia de glucosa en la estructura es un factor importante, así como, los grupos hidroxilo que están involucrados en la unión a iones de Zn del centro activo de la enzima.

Considerando que la trombosis es parte integral de la ECV, la inhibición de la ECA juega un papel importante, no sólo en su inicio, sino también en la progresión de la lesión ateromatosa, en la ruptura de la placa y en la aparición de accidentes trombóticos. No hay que olvidar que la ECV es un proceso multifactorial inducido por la presencia de factores de riesgo como la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes y el tabaquismo. Parte de los efectos beneficiosos atribuidos al consumo de alimentos ricos en polifenoles están relacionados con la disminución de los valores de tensión arterial, cuyo potencial mecanismo sería la inhibición de la ECA en la que estarían implicados tanto los antocianos como sus metabolitos.

Por lo tanto, la importancia de evitar la conversión de la Ang II es clave en el desarrollo de enfermedades vasculares ya que previene del estrés oxidativo, disminuye la tensión arterial y limita la respuesta inflamatoria.

V. Determinación de la actividad estrogénica/antiestrogénica por su implicación en el desarrollo aterosclerótico mediante el estudio de la afinidad por receptores estrogénicos

Otro de los mecanismos clave por el que los antocianos y sus metabolitos pueden limitar el desarrollo aterosclerótico es su actividad estrogénica/antiestrogénica. La importancia biológica de la interacción entre estos compuestos y los receptores estrogénicos es relevante porque pueden modular el perfil lipídico o la expresión de genes dependiente de estrógenos como el NF- κ B^{226, 231}. En este sentido, el **quinto objetivo** pretendió establecer la afinidad entre antocianos o sus metabolitos con receptores estrogénicos mediante la predicción teórica del modo de unión a los receptores estrogénicos o ensayos de competición con estradiol marcado.

A pesar de ser necesarias cantidades superiores que con 17- β estradiol, tanto los estudios teóricos del modo de unión (docking) como los ensayos de competición de unión a receptores estrogénicos con estradiol marcado indican datos positivos en la afinidad por los receptores (**Artículo 3**), en concreto peonidina-3-glucósido mostró afinidad por ER- α , delfinidina-3-glucósido por ER- β y pelargonidina-3-glucósido por ambos. Al igual que en este estudio, algunos autores han demostrado que los antocianos muestran una cierta afinidad selectiva por los receptores estrogénicos. Las concentraciones que fueron necesarias en un estudio previo parecen ser menores que en el nuestro, posiblemente porque han usado el aglicón del antociano y no el antociano tal cual aparece en los alimentos²³⁷. Además, nuestros datos señalan que los grupos hidroxilo son los responsables de las interacciones con los sitios de unión al ligando del receptor estrogénico. De forma similar, en el estudio de Fang *et al.*³¹⁸, la presencia de más de 2 hidroxilos en la molécula le hace más afín por ER- β que por ER- α . Esta afinidad selectiva hacia ambos receptores puede ser una propiedad positiva en la modulación de ciertas actividades, sin embargo, serían necesarios más estudios con modelos celulares.

De forma novedosa, observamos que ácidos fenólicos como los ácidos gálico o protocatéquico también son capaces de unirse a dichos receptores siendo necesarias para la interacción dos moléculas. Este hecho se verifica con el ácido gálico al ser necesaria una cantidad aproximadamente dos veces superior de ácido gálico que de delfinidina-3-glucósido en el ensayo de competición por los receptores. Estas últimas observaciones son relevantes ya que el ácido gálico podría considerarse como un enteroestrógeno:

metabolito producido por la flora intestinal que podría llegar a tener más actividad estrogénica/antiestrogénica que su precursor.

El papel protector frente a la aterosclerosis vía receptores estrogénicos está íntimamente relacionado con la modulación del perfil lipídico²²⁵. Este efecto hace referencia a la síntesis de lipoproteínas y a la disminución de lípidos plasmáticos evitando así la vulnerabilidad a la oxidación. Además, regulan la actividad de la enzima superóxido dismutasa y la captación de radicales libres limitando la oxidación de LDL²³².

El déficit en la producción endotelial de NO es otro componente importante del daño vascular que es modulado por receptores estrogénicos. Este NO es un importante vasodilatador endotelial cuya inhibición de NF- κ B es responsable de suprimir la expresión de marcadores inflamatorios. Además, el NO inhibe también la adhesión de plaquetas al endotelio, puede reducir la permeabilidad de la pared arterial y suprime la proliferación y migración de células de músculo liso vascular³¹⁹. Hay que señalar que la regulación de la expresión génica de receptores de angiotensina y la inhibición directa de NF- κ B son también factores implicados en la modulación vía receptores estrogénicos.

Por lo tanto, no sólo la disfunción endotelial, sino el proceso inflamatorio subsiguiente se ven potencialmente influenciados por antocianos y metabolitos vía receptores estrogénicos. Aunque este estudio y otras evidencias epidemiológicas aluden a que estos compuestos poseen efectos estrogénicos, necesitan ser estudiados ampliamente para poder ser considerados fitoestrógenos.

En resumen, la realización final de esta Tesis Doctoral permite disponer de una visión global del trabajo desarrollado:

Mientras que la mayoría de los estudios se centran en evaluar la biodisponibilidad de los antocianos o sus efectos en la salud, nuestro enfoque, sin embargo, pretende examinar qué ocurre con los antocianos que llegan al colon y cuál es su contribución a sus posibles efectos saludables.

Los resultados analizados en este trabajo indican que los antocianos sirven de sustrato para las bacterias intestinales. Así pues, la ruptura del enlace β -glicosídico exhibida por cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* sugiere ser el primer paso del catabolismo de antocianos. Como ya indican otros estudios con flavonoides, la

ruptura del anillo B para dar lugar a sus correspondientes ácidos fenólicos como siríngeo y gálico, así como derivados aromáticos parece ser la vía común de la degradación. Por ello, la ingesta de alimentos ricos en antocianos origina en plasma un aumento de ácidos fenólicos y otros metabolitos provenientes de sucesivas transformaciones de estos sustratos. No obstante, la diversidad de ácidos fenólicos y compuestos aromáticos generados, no sólo depende de la flora de cada individuo, sino que, como indica la degradación de delfinidina-3-glucósido, también depende de las simultáneas degradaciones químicas ocurridas en el medio, así como de sus estructuras moleculares.

Es necesario resaltar la implicación nutricional de estos resultados. La baja biodisponibilidad de los antocianos ha sido desde siempre subestimada ya que los metabolitos generados deben ser considerados a la hora de establecer la biodisponibilidad de antocianos y de los numerosos efectos asociados a su consumo.

Uno de los factores de riesgo de la ECV es el incremento de las LDL circulantes en plasma y en especial de las LDLox. Los mecanismos que probablemente tienen lugar se resumen en la denominada “hipótesis oxidativa de la aterosclerosis”, según la cual, el ateroma lo forman células espumosas, originadas en el subendotelio vascular a partir de macrófagos que han captado masivamente LDL, previamente oxidadas. Estas LDL resultan citotóxicas para el endotelio y quimiotácticas para los macrófagos y promueven la presencia de éstos en la lámina íntima de los vasos sanguíneos.

Distintas vías convergen para explicar los efectos beneficiosos aportados por alimentos con un alto contenido de sustancias polifenólicas. Según las observaciones realizadas en la presente Tesis, los antocianos y sus metabolitos pueden emplear varios mecanismos defensivos frente a las primeras lesiones de la pared arterial que expliquen los efectos observados en la salud.

Por un lado, reafirmando los datos de estudios epidemiológicos^{320, 321}, estos compuestos pueden desempeñar acciones antioxidantes implicadas, por ejemplo, en la inhibición de la oxidación de las LDL vía receptores estrogénicos, secuestro de iones metálicos en el medio, aportación y/o regeneración de moléculas antioxidantes o la reducción de EROS en el endotelio. En este estudio, la inhibición observada de la ECA especialmente por parte de todos los antocianos ensayados y dos de los principales productos de degradación, el ácido gálico y el ácido *p*-cumárico, sugiere la reducción de radicales libres. Así mismo, la leve disminución del NO segregado por macrófagos fortalece la idea de que los ácidos fenólicos puedan aminorar un ambiente oxidativo. Sin

embargo, hay multitud de factores que afectan al nivel antioxidante en plasma y que pueden dar lugar a un desequilibrio entre antioxidantes/prooxidantes; por ejemplo, se ha establecido que el tabaquismo agota las reservas de antioxidantes aumentando la posibilidad de formarse LDLox. Dado que una mayor capacidad antioxidante en plasma evitaría estos procesos, son de relevancia los resultados encontrados en los que se demuestra que las interacciones entre los antocianos y otros fenoles podrían repercutir en su capacidad antioxidante *in vivo* tras la ingesta de alimentos ricos en estos compuestos.

Cabe destacar que la hipercolesterolemia es un eslabón clave en el desarrollo de la aterosclerosis. Antocianos como pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, delfinidina-3-glucósido o su metabolito ácido gálico, por su parte, podrían disminuir los niveles de LDL en sangre a consecuencia de su interacción con receptores estrogénicos, lo que tiene una clara significación antiaterogénica. En suma, la disminución de colesterol sérico observado tras el consumo de antocianos podría también justificarse por la modulación selectiva en el colon de bacterias como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Aunque aún son escasas las evidencias, todo apunta a que ciertas cepas de estas bacterias podrían actuar inhibiendo la síntesis de colesterol, su absorción o la conversión enzimática del colesterol^{257, 322, 323}.

Por otro lado, los antocianos y sus metabolitos pueden actuar a nivel celular previniendo el desarrollo de la placa ateromatosa. A la formación de dicha placa contribuye el reclutamiento de monocitos; metabolitos como los ácidos protocatéquico y gálico pueden interferir con esta vía de señalización inhibiendo la expresión de moléculas proinflamatorias, citoquinas, moléculas de adhesión y quimiotácticas.

Como se ha comentado previamente, la inhibición de la ECA es otro factor clave en la prevención de la aterosclerosis, en esta ocasión atenuando la inducción de la respuesta inflamatoria en la pared vascular, así como, evitando la progresión de la lesión aterosclerótica. En este sentido, en virtud de la afinidad de ciertos antocianos y el ácido gálico por receptores estrogénicos, aunque con una afinidad sustancialmente menor que el estradiol, se sugiere que tanto la inhibición de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión como la modulación de la Ang II estarían reguladas por la expresión de ciertos genes. A pesar de la dilucidación de estos mecanismos, las concentraciones con actividad se alejan de las encontradas fisiológicamente en plasma. Parece ser que los efectos antiinflamatorios encontrados no sólo provienen de estos mecanismos aislados sino que la modulación bacteriana en el colon estaría potenciando

de forma sinérgica los efectos encontrados mediante la modulación de la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios. Además, como indica algún estudio, la actividad de cepas bacterianas de *Lactobacillus* pueden afectar sinérgicamente en la modulación de la respuesta inmune³²⁴.

Uno de los muchos factores de riesgo implicado en la ECV es la hipertensión arterial. Por esta razón, la inhibición de la ECA es otra propiedad relacionada con los efectos preventivos de la ECV. Los efectos vasodilatadores presentados tras el consumo de vino responderían a una acción combinada del incremento de bradiquinina, potente vasodilatador y a la prevención de la conversión de Ang II, un potente vasoconstrictor y estimulador de la aldosterona.

A pesar de que todos los resultados obtenidos muestran ligeros efectos protectores frente a la ECV, la interpretación de los resultados es complicada ya que las concentraciones requeridas para ello son sustancialmente superiores a las alcanzadas en plasma por parte de antocianos y ácidos fenólicos. Aún así, el papel de los antocianos y sus metabolitos no puede ser ignorado. En la mayoría de los casos, uno sólo de los mecanismos observados no podría explicarse aisladamente, por lo que todos estos mecanismos deben producirse de forma simultánea para explicar el efecto global encontrado *in vivo*.

Aunque queda pendiente llevar a cabo estudios de intervención con humanos para ampliar la aplicabilidad de los resultados, la elaboración de esta Tesis ha permitido disponer de datos científicos que confirman que los numerosos efectos beneficiosos atribuidos al consumo de antocianos también son debidos a la bioactividad de sus metabolitos fenólicos. Nuestros datos indican que los diferentes mecanismos a través de sus acciones antioxidantes y a su papel regulador en vías de señalización celular y de expresión génica convergen en una reducción del inicio aterosclerótico. Por lo tanto, las bases moleculares descritas de la posible actividad antiaterogénica de los antocianos y sus metabolitos generados, podrían servir como base científica para recomendar el consumo de alimentos ricos en antocianos.

7 CONCLUSIONES

PRIMERA

Los antocianos que llegan al colon pueden ser degradados químicamente o por enzimas bacterianas previa ruptura del enlace β -glicosídico, liberando al medio principalmente ácidos fenólicos correspondientes al anillo B del antociano y otros compuestos aromáticos derivados del anillo A.

SEGUNDA

De forma simultánea a su fermentación microbiana en el colon, los antocianos pueden modular la microbiota intestinal, aumentando el número de bacterias beneficiosas para la salud como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y disminuyendo las potencialmente perjudiciales como *Bacteroides* y *C. histolyticum*, lo cual podría dar lugar a efectos saludables tanto en el intestino como a nivel sistémico.

TERCERA

Las interacciones entre antocianos y otros flavonoides presentes en un mismo medio pueden modificar su conformación y producir, en términos de capacidad antioxidante, efectos antagónicos en el caso de la interacción entre miricetina y quercetina o quercetina-3- β -glucósido y un antociano o por el contrario efectos sinérgicos como es el caso de kaempferol y miricetina, kaempferol y quercetina, epicatequina y quercetina-3- β -glucósido, epicatequina y miricetina o catequina y quercetina-3- β -glucósido.

CUARTA

Tanto los antocianos ingeridos como sus metabolitos podrían contribuir a la prevención del desarrollo aterosclerótico mediante la inhibición de la secreción de moléculas proinflamatorias tales como moléculas prooxidantes (NO) y citoquinas (TNF- α) en macrófagos o moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) y quimioquinas (MCP-1) en el endotelio.

QUINTA

Todos los antocianos y ácidos fenólicos ensayados en este estudio han mostrado cierta capacidad inhibidora de la ECA, especialmente los antocianos y en menor extensión los ácidos gálico, cafeico y *p*-cumárico.

SEXTA

Algunos antocianos y sus metabolitos poseen afinidad por receptores estrogénicos siendo esta una posible vía de disminución de la placa de ateroma.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998; 56: 317-33.
2. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C and Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005; 45: 287-306.
3. Visioli F and Davalos A. Polyphenols and cardiovascular disease: A critical summary of the evidence. *Mini Reviews in Medicina Chemistry*. 2011; 11: 1186-90.
4. Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and parkinson's disease. *Neurochemical Research*. 2009; 34: 630-8.
5. Middleton E, Kandaswami C and Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000; 52: 673-751.
6. Shahidi F and Naczk M. *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc, 1995.
7. Tomás-Barberán FA and Clifford MN. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; 80: 1024-32.
8. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C and Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 79: 727-47.
9. Russell WR and Duthie GG. Plant secondary metabolites and gut health: The case for phenolic acids. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2011, p. 389-96.
10. Piñeiro Z, Cantos-Villar E, Palma M and Puertas B. Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 11683-9.
11. Cabrini L, Barzanti V, Cipollone M, et al. Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: 6026-32.
12. Vitrac X, Moni JP, Vercauteren J, Deffieux G and Mérillon JM. Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 2002; 458: 103-10.
13. Moreno-Franco B, García-González A, Montero-Bravo AM, et al. Dietary alkylresorcinols and lignans in the Spanish diet: Development of the Alignia database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 9827-34.
14. Rusznyak S and Gyorgyi AS. Vitamin P - Flavonols as vitamins. *Nature*. 1936; 138: 27.
15. Harborne JB. The anthocyanins. In: Harborne JB (ed.). *The flavonoids: advances in research since 1986*. London: Chapman & Hall, 1993; p. 1-20.
16. Hollman PCH and Arts ICW. Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; 80:1081–93.
17. Tomás-Barberán FA and Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; 80: 1073-80.

18. Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B and Engelhardt UH. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 2848-52.
19. Arts ICW, van de Putte B and Hollman PCH. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 1746-51.
20. de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C and Rivas-Gonzalo JC. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 5331-7.
21. Santos-Buelga C and Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; 80: 1094-117.
22. Cassidy A, Hanley B and Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; 80: 1044-62.
23. Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*. 1999; 70: 1-9.
24. Prior RL and Wu X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*. 2006; 40: 1014-28.
25. Brouillard R. Chemical structure of anthocyanins. In: Markakis P, (ed.). *Anthocyanins as food colours*. New York: Academic Press, 1982, p. 1-40.
26. Jaganath IB and Crozier A. Dietary flavonoids and phenolic compounds. In: John Wiley & Sons I (ed.). *Plant phenolics and human health: Biochemistry, nutrition and pharmacology*. Hoboken, New Jersey. 2010.
27. Asenstorfer RE, Iland PG, Tate ME and Jones GP. Charge equilibria and pKa of malvidin-3-glucoside by electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 2003; 318: 291-9.
28. Brouillard R, Chassaing S, Isorez G, Kueny-Stotz M and Figueiredo P. The visible flavonoids or anthocyanins: from research to applications. In: Santos-Buelga C, Escribano-Bailon MT and Lattanzio V, (eds.). *Recent Advances in Polyphenol Research*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010.
29. Houbiers C, Lima JC, Maçanita AL and Santos H. Color stabilization of malvidin 3-glucoside: Self-aggregation of the flavylum cation and copigmentation with the Z-chalcone form. *Journal of Physical Chemistry B*. 1998; 102: 3578-85.
30. Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH and Törrönen AR. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55: 1612-9.
31. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE and Prior RL. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54: 4069-75.
32. Mazza G and Miniati E. *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Boca Raton CRC Press, 1993.
33. Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA and Diamantidis G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*. 2007; 102: 777-83.

34. Macz-Pop GA, Rivas-Gonzalo JC, Pérez-Alonso JJ and González-Paramás AM. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*. 2006; 94: 448-56.
35. Ferreres F, Gil MI and Tomás-Barberán FA. Anthocyanins and flavonoids from shredded red onion and changes during storage in perforated films. *Food Research International*. 1996; 29: 389-95.
36. Kosar M, Altintas A, Kirimer N and Baser KHC. Determination of the free radical scavenging activity of *Lycium* extracts. *Chemistry of Natural Compounds*. 2003; 39: 531-5.
37. Lopez-da-Silva F, Escribano-Bailón MT, Pérez Alonso JJ, Rivas-Gonzalo JC and Santos-Buelga C. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology*. 2007; 40: 374-82.
38. Wojdyło A, Oszmiański J and Laskowski P. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56: 6520-30.
39. Giusti MM and Wrolstad RE. Characterization of red radish anthocyanins. *Journal of Food Science*. 1996; 61: 322-6.
40. Alighourchi H, Barzegar M and Abbasi S. Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology*. 2008; 227: 881-7.
41. Wang SY and Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 140-6.
42. Teissedre PL and Landrault N. Wine phenolics: Contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International*. 2000; 33: 461-7.
43. Sánchez-Moreno C, Cao G, Ou B and Prior RL. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 4889-96.
44. Prior RL, Cao G, Martin A, et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of vaccinium species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46: 2686-93.
45. Wang SY, Chen CT, Sciarappa W, Wang CY and Camp MJ. Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56: 5788-94.
46. Müller D, Schantz M and Richling E. High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices. *Journal of Food Science*. 2012; 77: 340-5.
47. Gao L and Mazza G. Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995; 43: 343-6.
48. Ryu SN, Park SZ and Ho CT. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. *Journal of Food and Drug Analysis*. 1998; 6: 729-36.
49. Lamikanra O. Anthocyanins of *Vitis rotundifolia* hybrid grapes. *Food Chemistry*. 1989; 33: 225-37.

50. Cevallos-Casals BA and Cisneros-Zevallos L. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 3313-9.
51. Kaack K and Austed T. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1998; 52: 187-98.
52. de Pascual-Teresa S, Moreno DA and García-Viguera C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010; 11: 1679-703.
53. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 1976, p. 117-91.
54. Pérez-Jiménez J, Fezeu L, Touvier M, et al. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2011; 93: 1-9.
55. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; 80: 1033-43.
56. Chun OK, Chung SJ and Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *Journal of Nutrition*. 2007; 137: 1244-52.
57. Heinonen M. Anthocyanins as dietary antioxidants. In: Voutilainen S, Salonen, JT, (ed.). *Third international conference on natural antioxidants and anticarcinogens in food, health, and disease (NAHD)*. Helsinki, Finland. 2001, p. 2001-25.
58. Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, et al. Estimation of dietary sources and flavonoid intake in a spanish adult population (EPIC-Spain). *Journal of the American Dietetic Association*. 2010; 110: 390-8.
59. Beking K and Vieira A. An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011; 62: 17-9.
60. Abdel-Aal ESM and Hucl P. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*. 1999; 76: 350-4.
61. Zou T, Wang D, Guo H, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. *Journal of Food Science*. 2012; 77: 46-50.
62. Yang H, Li X, Tang Y, Zhang N, Chen J and Cai B. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC-DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009; 49: 140-4.
63. Abdel-Aal ESM, Young JC and Rabalski I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54: 4696-704.
64. Schwarz M, Hillebrand S, Habben S, Degenhardt A and Winterhalter P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal*. 2003; 14: 179-89.
65. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MdL, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA and Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009; 113: 859-71.
66. Sáenz-López R, Fernández-Zurbano P and Tena MT. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine. *Journal of Chromatography A*. 2003; 990: 247-58.

67. Cooper KA, Campos-Giménez E, Alvarez DJ, Nagy K, Donovan JL and Williamson G. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55: 2841-7.
68. Escribano-Bailón MT, Santos-Buelga C and Rivas-Gonzalo JC. Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1054: 129-41.
69. da Costa CT, Horton D and Margolis SA. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2000; 881: 403-10.
70. Robards K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*. 2003; 1000: 657-91.
71. He XG. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. *Journal of Chromatography A*. 2000; 880: 203-32.
72. Srinivasan VS. Bioavailability of nutrients: A practical approach to *in vitro* demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *Journal of Nutrition*. 2001; 131: 1349S-50S.
73. Cao G, Muccitelli HU, Sánchez-Moreno C and Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001; 73: 920-6.
74. Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M and Tsuda T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: 1546-51.
75. Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K and Someya K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3- glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999; 47: 1083-91.
76. Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A and Mattivi F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*. 2003; 544: 210-3.
77. Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Lamaison JL and Remesy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *Journal of Nutrition*. 2003; 133: 4178-82.
78. Fernandes I, de Freitas V, Reis C and Mateus N. A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. *Food & Function*. 2012; 3: 508-16.
79. Hollman PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH and Katan MB. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*. 1999; 31: 569-73.
80. Hassimotto NMA, Genovese MI and Lajolo FM. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutrition Research*. 2008; 28: 198-207.
81. Faria A, Pestana D, Azevedo J, et al. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009; 53: 1430-7.
82. Lapidot T, Harel S, Granit R and Kanner J. Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46: 4297-302.

83. Felgines C, Talavera S, Gonthier MP, et al. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *Journal of Nutrition*. 2003; 133: 1296-301.
84. Ohnishi R, Ito H, Kasajima N, et al. Urinary excretion of anthocyanins in humans after cranberry juice ingestion. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2006; 70: 1681-7.
85. Kay CD. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutrition Research Reviews*. 2006; 19: 137-46.
86. Bub A, Watzl B, Heeb D, Rechkemmer G and Briviba K. Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *European Journal of Nutrition*. 2001; 40: 113-20.
87. Cao G and Prior RL. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clinical Chemistry*. 1999; 45: 574-6.
88. Murkovic M, Adam U and Pfannhauser W. Analysis of anthocyanine glycosides in human serum. *Journal of Analytical Chemistry*. 2000; 366: 379-81.
89. Netzel M, Strass G, Janssen M, Bitsch I and Bitsch R. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 2001; 20: 89-95.
90. Müllleder U, Murkovic M and Pfannhauser W. Urinary excretion of cyanidin glycosides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2002; 53: 61-6.
91. Mazza G, Kay CD, Cottrell T and Holub BJ. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 7731-7.
92. Milbury PE, Cao G, Prior RL and Blumberg J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2002; 123: 997-1006.
93. Wu X, Cao G and Prior RL. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *Journal of Nutrition*. 2002; 132: 1865-71.
94. Frank T, Netzel M, Strass G, Bitsch R and Bitsch I. Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2003; 81: 423-35.
95. Nielsen ILF, Dragsted LO, Ravn-haren G, Freese R and Rasmussen SE. Absorption and excretion of blackcurrant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 2813-20.
96. McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM and Jensen DJ. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 4539-48.
97. Kay CD, Mazza G, Holub BJ and Wang J. Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *British Journal of Nutrition*. 2004; 91: 933-42.
98. Felgines C, Talavera S, Texier O, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL and Remesy C. Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 7721-7.
99. Garcia-Alonso M, Minihane A-M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC and de Pascual-Teresa S. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2009; 20: 521-9.

100. McGhie TK and Walton MC. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2007; 51: 702-13.
101. Clifford MN. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*. 2004; 70: 1103-14.
102. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A and Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81: 230S-42S.
103. Tsuda T, Horio F and Osawa T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- β -D-glucoside in rats. *FEBS Letters*. 1999; 449: 179-82.
104. Kahle K, Kraus M, Scheppach W, Ackermann M, Ridder F and Richling E. Studies on apple and blueberry fruit constituents: Do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Molecular Nutrition and Food Research*. 2006; 50: 418-23.
105. Kraus M, Kahle K, Ridder F, et al. Colonic availability of bilberry anthocyanins in humans. Flavor and health benefits of small fruits. American Chemical Society, 2010, p. 159-76.
106. González-Barrio R, Borges G, Mullen W and Crozier A. Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58: 3933-9.
107. Aura AM, Martin-Lopez P, O'Leary KA, et al. *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*. 2005; 44: 133-42.
108. Keppler K and Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2005; 13: 5195-205.
109. Alberto MR, Gómez-Cordovés C and Manca de Nadra MC. Metabolism of gallic acid and catechin by *Lactobacillus hilgardii* from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52: 6465-9.
110. Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *Journal of Nutrition*. 2007; 137: 2043-8.
111. Fleschhut J, Kratzer F, Reckemmer G and Kulling SE. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *European Journal of Nutrition*. 2006; 45: 7-18.
112. Wu X, Pittman HE, Hager T, Hager A, Howard L and Prior RL. Phenolic acids in black raspberry and in the gastrointestinal tract of pigs following ingestion of black raspberry. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009; 53: S76-S84.
113. Russell WR, Scobbie L, Labat A and Duthie GG. Selective bio-availability of phenolic acids from Scottish strawberries. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009; 53: S85-S91.
114. Forester SC and Waterhouse AL. Identification of cabernet sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56: 9299-304.
115. Nurmi T, Mursu J, Heinonen M, Nurmi A, Hiltunen R and Voutilainen S. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 2274-81.
116. Gill CIR, McDougall GJ, Glidewell S, et al. Profiling of phenols in human fecal water after raspberry supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58: 10389-95.
117. Galvano F, La Fauci L, Vitaglione P, Fogliano V, Vanella L and Felgines C. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*. 2007; 43: 382-93.

118. Kay CD, Kroon PA and Cassidy A. The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009; 53: S92-S101.
119. Talavera S, Felgines C, Texier O, et al. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 3902-8.
120. Matsumoto H, Nakamura Y, Iida H, Ito K and Ohguro H. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Experimental Eye Research*. 2006; 83: 348-56.
121. Williamson G and Clifford MN. Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*. 2010; 104: S48-S66.
122. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA and Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307: 1915-20.
123. Schoefer L, Mohan R, Braune A, Birringer M and Blaut M. Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. *FEMS Microbiology Letters*. 2002; 208: 197-202.
124. Schoefer L, Mohan R, Schwiertz A, Braune A and Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69: 5849-54.
125. Schneider H, Schwiertz A, Collins MD and Blaut M. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Archives of Microbiology*. 1999; 171: 81-91.
126. Braune A, Gütschow M, Engst W and Blaut M. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67: 5558-67.
127. Tuohy K and Gibson GR. Functions of the human intestinal flora: The use of probiotics and prebiotics. In: Crozier A, Clifford MN and Ashihara H, (eds.). *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford: Blackwell 2006.
128. Phipps AN, Stewart J, Wright B and Wilson ID. Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity. *Xenobiotica*. 1998; 28: 527-37.
129. Berry DF, Francis AJ and Bollag JM. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiological Reviews*. 1987; 51: 43-59.
130. Hattori M, Shu YZ, El-Sedawy AI, Namba T, Kobashi K and Tomimori T. Metabolism of homoorientin by human intestinal bacteria. *Journal of Natural Products*. 1988; 51: 874-8.
131. Daniel EM, Ratnayake S, Kinstle T and Stoner GD. The effects of pH and rat intestinal contents on the liberation of ellagic acid from purified and crude ellagitannins. *Journal of Natural Products*. 1991; 54: 946-52.
132. Kroon PA, Faulds CB, Ryden P, Robertson JA and Williamson G. Release of covalently bound reric acid from fiber in the human colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997; 45: 661-7.
133. Goodwin BL, Ruthven CRJ and Sandler M. Gut flora and the origin of some urinary aromatic phenolic compounds. *Biochemical Pharmacology*. 1994; 47: 2294-7.

134. Lee HC, Jenner AM, Low CS and Lee YK. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*. 2006; 157: 876-84.
135. Schoefer L, Braune A and Blaut M. Cloning and expression of a phloretin hydrolase gene from *Eubacterium ramulus* and characterization of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70: 6131-7.
136. Schneider H and Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Archives of Microbiology*. 2000; 173: 71-5.
137. Hur HG and Rafii F. Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum*. *FEMS Microbiology Letters*. 2000; 192: 21-5.
138. Winter J, Moore LH, Dowell Jr VR and Bokkenheuser VD. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989; 55: 1203-8.
139. Bokkenheuser VD, Shackleton CHL and Winter J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochemical Journal*. 1987; 248: 953-6.
140. Kim DH, Sohng IS, Kobashi K and Han MJ. Purification and characterization of β -glucosidase from Bacteroides JY- 6, a human intestinal bacterium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1996; 19: 1121-5.
141. Sung CK, Kang GH, Yoon SS, et al. Glycosidases that convert natural glycosides to bioactive compounds. In: Waller GR and Yamasaki K, (eds.). *Saponins used in traditional and modern medicine, advances in experimental medicine and biology*. New York: Kluwer Academic Publisher, 1996, p. 23-36.
142. Aura AM, O'Leary KA, Williamson G, et al. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 1725-30.
143. Déprez S, Brezillon C, Rabot S, et al. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *Journal of Nutrition*. 2000; 130: 2733-8.
144. He J and Giusti MM. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2010; 1: 163-87.
145. Domitrović R. The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. *Current Medicinal Chemistry*. 2011; 18: 4454-69.
146. Jeong JH, Jung H, Lee SR, Lee HJ, Hwang KT and Kim TY. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chemistry*. 2010; 123: 338-44.
147. Liu M, Li XQ, Weber C, Lee CY, Brown J and Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 2926-30.
148. Liu Z, Schwimer J, Liu D, Greenway FL, Anthony CT and Woltering EA. Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 3909-15.
149. Edirisinghe I, Banaszewski K, Cappozzo J, et al. Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. *British Journal of Nutrition*. 2011; 106: 913-22.
150. Kwon SH, Ahn IS, Kim SO, et al. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *Journal of Medicinal Food*. 2007; 10: 552-6.

151. Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK and Nair MG. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 28-31.
152. Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56: 705-12.
153. Kolosova NG, Lebedev PA and Dikalova AE. Comparison of antioxidants in the ability to prevent cataract in prematurely aging OXYS rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2004; 137: 249-51.
154. Lee J, Lee HK, Kim CY, et al. Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects. *British Journal of Nutrition*. 2005; 93: 895-9.
155. Shih P-H, Wu C-H, Yeh C-T and Yen G-C. Protective effects of anthocyanins against amyloid beta-peptide-induced damage in neuro-2A cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 1683-9.
156. Spencer JPE. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British Journal of Nutrition*. 2010; 104: S40-S7.
157. Wu VCH, Qiu X, Bushway A and Harper L. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*. 2008; 41: 1834-41.
158. Caillet S, Côté J, Sylvain JF and Lacroix M. Antimicrobial effects of fractions from cranberry products on the growth of seven pathogenic bacteria. *Food Control*. 2012; 23: 419-28.
159. Nohynek LJ, Alakomi HL, Kähkönen MP, et al. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*. 2006; 54: 18-32.
160. Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Azuma M and Knox YM. Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. *Phytotherapy Research*. 2003; 17: 609-13.
161. Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*. 2012; 86: 345-91.
162. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T and Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001; 104: 2673-8.
163. Delgado L and Martínez G. Oxidative stress in cardiovascular disease: Evidences for a more integral treatment. *Revista Cubana de Farmacia*. 2009; 43.
164. Butterfield DA, Castegna A, Pocernich CB, Drake J, Scapagnini G and Calabrese V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13: 444-61.
165. Dai J and Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15: 7313-52.
166. Lee J, Koo N and Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2004; 3: 21-33.
167. Sánchez-Moreno C, Jimenez-Escrig A and Martin A. Stroke: Roles of B vitamins, homocysteine and antioxidants. *Nutrition Research Reviews*. 2009; 22: 49-67.

168. Gutteridge JMC. Biological origin of free-radicals and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*. 1994; 91: 133-40.
169. Kadoma Y, Ishihara M, Okada N and Fujisawa S. Free radical interaction between vitamin E (alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherol), ascorbate and flavonoids. *In Vivo*. 2006; 20: 823-7.
170. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, et al. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000; 72: 1150-5.
171. Pinelo M, Manzocco L, Nunez MJ and Nicoli MC. Interaction among phenols in food fortification: Negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52: 1177-80.
172. Huang D, Boxin OU and Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 1841-56.
173. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S and Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002; 127: 183-98.
174. Sánchez-Moreno C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 2002; 8: 121-37.
175. Prior RL, Wu X and Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 4290-302.
176. Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM and Garcia-Parrilla MC. Antioxidant activity of phenolic compounds: From *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008; 48: 649-71.
177. Tsuda T, Horio F and Osawa T. The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. *BioFactors*. 2000; 13: 133-9.
178. Huang WY, Zhang HC, Liu WX and Li CY. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University: Science B*. 2012; 13: 94-102.
179. Goupy P, Bautista-Ortin AB, Fulcrand H and Dangles O. Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: Hydrogen transfer reactions to the DPPH radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 5762-70.
180. Wang H, Cao G and Prior RL. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997; 45: 304-9.
181. Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996; 20: 933-56.
182. Zhang M, Swarts SG, Yin L, et al. Antioxidant properties of quercetin. *Advance in Experimental Medicine and Biology*. 2011, p. 283-9.
183. Steed LE and Truong VD. Anthocyanin content, antioxidant activity, and selected physical properties of flowable purple-fleshed sweetpotato purees. *Journal of Food Science*. 2008; 73: S215-S21.
184. Koca I and Karadeniz B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*. 2009; 121: 447-50.

185. Muselík J, García-Alonso M, Martín-López MP, Žemlička M and Rivas-Gonzalo JC. Measurement of antioxidant activity of wine catechins, procyanidins, anthocyanins and pyranoanthocyanins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2007; 8: 797-809.
186. Kaplan M, Hayek T, Raz A, et al. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *Journal of Nutrition*. 2001; 131: 2082-9.
187. Turner MK. Anthocyanins increase antioxidant enzyme activity in HT-29 adenocarcinoma cells. Tesis Doctoral. Athens, Georgia (USA), 2009.
188. García-Alonso M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC and de Pascual-Teresa S. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A - Studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52: 3378-84.
189. Kähkönen MP and Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 628-33.
190. Garcia-Alonso M, Rimbach G, Sasai M, et al. Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2005; 49: 1112-9.
191. Villaño D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM and García-Parrilla MC. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 538: 391-8.
192. Gülçin I, Topal F, Çakmakçi R, Bilsel M, Gören AC and Erdogan U. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus*L.). *Journal of Food Science*. 2011; 76: C585-C93.
193. Rivero-Pérez MD, Muñiz P and González-Sanjosé ML. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2815-22.
194. Philpott M, Lim CC and Ferguson LR. Dietary protection against free radicals: A case for multiple testing to establish structure-activity relationships for antioxidant potential of anthocyanic plant species. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009; 10: 1081-103.
195. Meyer AS, Heinonen M and Frankel EN. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*. 1998; 61: 71-5.
196. Rossetto M, Vanzani P, Mattivi F, Lunelli M, Scarpa M and Rigo A. Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002; 408: 239-45.
197. Jakobek L, Šeruga M and Krivak P. The influence of interactions among phenolic compounds on the antiradical activity of chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011; 62: 345-52.
198. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454: 428-35.
199. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M and Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2001; 10: 321-9.
200. Montecucco F, Pende A and Mach F. The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: Evidence from basic research and clinical studies. *Mediators of Inflammation*. 2009; 2009.

201. Grassi D, Desideri G and Ferri C. Cardiovascular risk and endothelial dysfunction: The preferential route for atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2011; 12: 1343-53.
202. Pashkow FJ. Oxidative stress and inflammation in heart disease: Do antioxidants have a role in treatment and/or prevention? *International Journal of Inflammation*. 2011; 2011: 1-9.
203. Ford MA, Allison TG and Lerman A. New approaches to the concept of primary prevention of atherosclerosis. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*. 2008; 10: 73-82.
204. Durante A, Peretto G, Laricchia A, et al. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*. 2012; 18: 981-1004.
205. Estruch R. Wine and cardiovascular disease. *Food Research International*. 2000; 33: 219-26.
206. Estruch R, Sacanella E, Badia E, et al. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: A prospective randomized crossover trial: Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*. 2004; 175: 117-23.
207. Sacanella E, Vázquez-Agell M, Mena MP, et al. Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: A randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 86: 1463-9.
208. Wang J and Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 850-7.
209. Hu C, Zawistowski J, Ling W and Kitts DD. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 5271-7.
210. Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M and Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*. 2007; 2007.
211. Min S-W, Ryu S-N and Kim D-H. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-beta-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *International Immunopharmacology*. 2010; 10: 959-66.
212. Pergola C, Rossi A, Dugo P, Cuzzocrea S and Sautebin L. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 2006; 15: 30-9.
213. Huebbe P, Giller K, de Pascual-Teresa S, et al. Effects of blackcurrant-based juice on atherosclerosis-related biomarkers in cultured macrophages and in human subjects after consumption of a high-energy meal. *British Journal of Nutrition*. 2011: 1-11.
214. Atalay M, Gordillo G, Roy S, et al. Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma. *FEBS Letters*. 2003; 544: 252-7.
215. Youdim KA, McDonald J, Kalt W and Joseph JA. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13: 282-8.

216. Speciale A, Canali R, Chirafisi J, Saija A, Virgili F and Cimino F. Cyanidin-3-O-glucoside protection against TNF-alpha-induced endothelial dysfunction: Involvement of nuclear Factor-kappa B signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58: 12048-54.
217. Nizamutdinova IT, Kim YM, Il Chung J, et al. Anthocyanins from black soybean seed coats preferentially inhibit TNF-alpha-mediated induction of VCAM-1 over ICAM-1 through the regulation of GATAs and IRF-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 7324-30.
218. Ojeda D, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, Herrera-Arellano A, Tortoriello J and Alvarez L. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 127: 7-10.
219. Persson IAL, Persson K and Andersson RGG. Effect of *vaccinium myrtillus* and its polyphenols on angiotensin-converting enzyme activity in human endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 4626-9.
220. Arts IC and Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81: 317S-25S.
221. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP and Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet*. 2007; 369: 1208-19.
222. Smiley DA and Khalil RA. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Current Medicinal Chemistry*. 2009; 16: 1863-87.
223. Masood D-e-N, Roach EC, Beauregard KG and Khalil RA. Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. *Current Drug Metabolism*. 2010; 11: 693-714.
224. Deroo BJ and Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116: 561-70.
225. Arnal JF, Laurell H, Fontaine C, et al. Estrogen receptor actions on vascular biology and inflammation: Implications in vascular pathophysiology. *Climacteric*. 2009; 12: 12-7.
226. Xing D, Nozell S, Chen Y-F, Hage F and Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2009; 29: 289-95.
227. Mueck AO and Seeger H. Estrogens acting as cardiovascular agents: Direct vascular actions. *Current Medicinal Chemistry: Cardiovascular and Hematological Agents*. 2004; 2: 35-42.
228. Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *American Journal of Cardiology*. 2002; 90: 3-6.
229. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML and Baltimore D. The I kappa B-NF-kappa B signaling module: Temporal control and selective gene activation. *Science*. 2002; 298: 1241-5.
230. Kurokawa A, Azuma K, Mita T, et al. 2-methoxyestradiol reduces monocyte adhesion to aortic endothelial cells in ovariectomized rats. *Endocrine Journal*. 2007; 54: 1027-31.
231. Huang W and Glass CK. Nuclear receptors and inflammation control: Molecular mechanisms and pathophysiological relevance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010; 30: 1542-9.
232. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circulation Research*. 2003; 93: 170-7.

233. Chakrabarti S, Lekontseva O, Peters A and Davidge ST. 17 beta-Estradiol induces protein S-nitrosylation in the endothelium. *Cardiovascular Research*. 2010; 85: 796-805.
234. Barton M, Meyer MR and Prossnitz ER. Estrogen-independent activation of estrogen receptors. *Hypertension*. 2011; 57: 1056-7.
235. de Kleijn MJJ, van der Schouw YT, Wilson PWF, Grobbee DE and Jacques PF. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal US women: The Framingham Study. *Journal of Nutrition*. 2002; 132: 276-82.
236. Galluzzo P and Marino M. Nutritional flavonoids impact on nuclear and extranuclear estrogen receptor activities. *Genes and Nutrition*. 2006; 1: 161-76.
237. Schmitt E and Stopper H. Estrogenic activity of naturally occurring anthocyanidins. *Nutrition and Cancer-an International Journal*. 2001; 41: 145-9.
238. Klinge CM, Risinger KE, Watts MB, Beck V, Eder R and Jungbauer A. Estrogenic activity in white and red wine extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 1850-7.
239. Chalopin M, Tesse A, Martinez MC, Rognan D, Arnal J-F and Andriantsitohaina R. Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium. *Plos One*. 2010; 5.
240. Simoncini T, Lenzi E, Zoehling A, et al. Estrogen-like effects of wine extracts on nitric oxide synthesis in human endothelial cells. *Maturitas*. 2011; 70: 169-75.
241. Wallace TC, Guarner F, Madsen K, et al. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutrition Reviews*. 2011; 69: 392-403.
242. Ohashi Y and Ushida K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal*. 2009; 80: 361-71.
243. FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ont. Canada. 2002.
244. Gibson GR and Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota-Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 1995; 125: 1401-12.
245. Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S and Black RE. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: A meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infectious Diseases*. 2006; 6: 374-82.
246. Hickson M. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2011; 4: 185-97.
247. Fukuda S, Toh H, Hase K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011; 469: 543-9.
248. Chapman CMC, Gibson GR and Rowland I. Health benefits of probiotics: Are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition*. 2011; 50: 1-17.
249. Fedorak RN and Dieleman LA. Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases: update 2008. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2008; 42 Suppl 2: S97-103.
250. Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, et al. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: A randomised controlled pilot trial. *Gut*. 2005; 54: 242-9.

251. Francavilla R, Lionetti E, Castellaneta SP, et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* infection in humans by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and effect on eradication therapy: A pilot study. *Helicobacter*. 2008; 13: 127-34.
252. Lesbros-Pantoflickova D, Corthésy-Theulaz I and Blum AL. *Helicobacter pylori* and probiotics. *Journal of Nutrition*. 2007; 137: 812S-8S.
253. Quigley EMM. The enteric microbiota in the pathogenesis and management of constipation. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. 2011; 25: 119-26.
254. Burns AJ and Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2000; 1: 13-24.
255. Vaarala O. Immunological effects of probiotics with special reference to *lactobacilli*. *Clinical and Experimental Allergy*. 2003; 33: 1634-40.
256. Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y and Roy D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology*. 2008; 10: 37-54.
257. Ooi LG and Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of *in Vivo* and *in Vitro* Findings. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010; 11: 2499-522.
258. Huang Y, Wang J, Cheng Y and Zheng Y. The hypocholesterolaemic effects of *Lactobacillus acidophilus* American type culture collection 4356 in rats are mediated by the down-regulation of Niemann-Pick C1-Like 1. *British Journal of Nutrition*. 2010; 104: 807-12.
259. Cavallini DC, Bedani R, Bomdespacho LQ, Vendramini RC and Rossi EA. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: A randomized double-blind study. *Lipids in Health and Disease*. 2009; 8.
260. Reid G, Beuerman D, Heinemann C and Bruce AW. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2001; 32: 37-41.
261. Kolida S, Tuohy K and Gibson GR. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. 2002; 87: S193-S7.
262. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi HL and Oksman-Caldentey KM. The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. *BioFactors*. 2005; 23: 243-51.
263. Lacombe A, Wu VCH, White J, Tadepalli S and Andre EE. The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology*. 2012; 30: 124-31.
264. Lacombe A, Wu VCH, Tyler S and Edwards K. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 139: 102-7.
265. Rodriguez Vaquero MJ, Alberto MR and Manca de Nadra MC. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 2007; 18: 93-101.
266. Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GGC, et al. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British Journal of Nutrition*. 2008; 99: 782-92.
267. Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C and Spencer JPE. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a

- randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2011; 93: 62-72.
268. de Boever P, Deplancke B and Verstraete W. Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *Journal of Nutrition*. 2000; 130: 2599-606.
269. Requena T, Monagas M, Pozo-Bayón MA, et al. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends in Food Science and Technology*. 2010; 21: 332-44.
270. Dolara P, Luceri C, De Filippo C, et al. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005; 591: 237-46.
271. Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR and Ferreira D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 140: 175-82.
272. Bialonska D, Kasimsetty SG, Schrader KK and Ferreira D. The effect of pomegranate (*punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 8344-9.
273. Molan A-L, Liu Z and Kruger M. The ability of blackcurrant extracts to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010; 26: 1735-43.
274. de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C and Rivas-Gonzalo JC. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002; 82: 1003-6.
275. Benzie IFF and Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239: 70-6.
276. Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995; 28: 25-30.
277. Sentandreu MA and Toldrá F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*. 2006; 97: 546-54.
278. WHO. World Health Statistics 2012. World Health Organization, 2012. (http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2012_Full.pdf).
279. Rissanen TH, Voutilainen S, Virtanen JK, et al. Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: The kuopio ischaemic heart disease risk factor (KIHD) study. *Journal of Nutrition*. 2003; 133: 199-204.
280. Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: A prospective study in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 85: 895-909.
281. Ellingsen I, Hjerkin EM, Seljeflot I, Arnesen H and Tonstad S. Consumption of fruit and berries is inversely associated with carotid atherosclerosis in elderly men. *British Journal of Nutrition*. 2008; 99: 674-81.
282. Erlund I, Koli R, Alfthan G, et al. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 87: 323-31.

283. Woodward G, Kroon P, Cassidy A and Kay C. Anthocyanin stability and recovery: Implications for the analysis of clinical and experimental samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 5271-8.
284. Rodríguez H, Landete JM, Rivas Bdl and Muñoz R. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chemistry*. 2008; 107: 1393-8.
285. Gonthier MP, Cheynier V, Donovan JL, et al. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *Journal of Nutrition*. 2003; 133: 461-7.
286. Aura AM. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*. 2008; 7: 407-29.
287. Ito S, Kato T and Fujita K. Covalent binding of catechols to proteins through the sulphhydryl group. *Biochemical Pharmacology*. 1988; 37: 1707-10.
288. Selma MV, Espin JC and Tomas-Barberan FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 6485-501.
289. Umadevi S, Gopi V, Simna SP, Parthasarathy A, Yousuf SMJ and Elangovan V. Studies on the cardio protective role of gallic acid against AGE-induced cell proliferation and oxidative stress in H9C2 (2-1) cells. *Cardiovascular Toxicology*. 2012: 1-8.
290. Larrosa M, Luceri C, Vivoli E, et al. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009; 53: 1044-54.
291. Gibson GR. Prebiotics as gut microflora management tools. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2008; 42 Suppl 2: S75-9.
292. Hord NG. Eukaryotic-microbiota crosstalk: Potential mechanisms for health benefits of prebiotics and probiotics. *Annual Review of Nutrition*. 2008; 28: 215-31.
293. Saulnier DM, Kolida S and Gibson GR. Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Current Pharmaceutical Design*. 2009; 15: 1403-14.
294. Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D and Rossi M. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73: 179-85.
295. Ranganna K, Yatsu FM, Hayes BE, Milton SG and Jayakumar A. Butyrate inhibits proliferation-induced proliferating cell nuclear antigen expression (PCNA) in rat vascular smooth muscle cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2000; 205: 149-61.
296. Tahri K, Crociani J, Ballongue J and Schneider F. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Letters in Applied Microbiology*. 1995; 21: 149-51.
297. Corthésy B, Gaskins HR and Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *Journal of Nutrition*. 2007; 137: 781S-90S.
298. Rault-Nania MH, Gueux E, Demougeot C, Demigné C, Rock E and Mazur A. Inulin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *British Journal of Nutrition*. 2006; 96: 840-4.
299. Kelly D, Conway S and Aminov R. Commensal gut bacteria: Mechanisms of immune modulation. *Trends in Immunology*. 2005; 26: 326-33.
300. Lupton JR. Microbial degradation products influence colon cancer risk: The butyrate controversy. *Journal of Nutrition*. 2004; 134: 479-82.

301. Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA and Calder PC. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sciences*. 2003; 73: 1683-90.
302. Hughes R, Magee EA and Bingham S. Protein degradation in the large intestine: Relevance to colorectal cancer. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2000; 1: 51-8.
303. Hervert-Hernández D, Pintado C, Rotger R and Goñi I. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *International Journal of Food Microbiology*. 2009; 136: 119-22.
304. Smith AH, Zoetendal E and Mackie RI. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*. 2005; 50: 197-205.
305. Garsetti M, Pellegrini N, Baggio C and Brighenti F. Antioxidant activity in human faeces. *British Journal of Nutrition*. 2000; 84: 705-10.
306. Kemperman RA, Bolca S, Roger LC and Vaughan EE. Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: Challenges and opportunities. *Microbiology*. 2010; 156: 3224-31.
307. Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, Arioli S, Klimis-Zacas D and Porrini M. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases Bifidobacteria in the human gut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 12815-20.
308. Roberfroid M. Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition*. 2007; 137: 830-7.
309. Plumb GW, de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Cheynier V and Williamson G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research*. 1998; 29: 351-8.
310. Reber JD, Eggett DL and Parker TL. Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011; 62: 445-52.
311. Tenore GC, Basile A and Novellino E. Antioxidant and antimicrobial properties of polyphenolic fractions from selected moroccan red wines. *Journal of Food Science*. 2011; 76: C1342-C8.
312. Peyrat-Maillard MN, Cuvelier ME and Berset C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 2003; 80: 1007-12.
313. Liao KL and Yin MC. Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: Importance of the partition coefficient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 2266-70.
314. Yan JJ, Jung JS, Hong YJ, et al. Protective effect of protocatechuic acid isopropyl ester against murine models of sepsis: Inhibition of TNF- α and nitric oxide production and augmentation of IL-10. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004; 27: 2024-7.
315. Caccetta RAA, Croft KD, Beilin LJ and Puddey IB. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000; 71: 67-74.
316. Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, et al. Red wine intake prevents nuclear factor- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation*. 2000; 102: 1020-6.

317. Wang D, Wei X, Yan X, Jin T and Ling W. Protocatechuic acid, a metabolite of anthocyanins, inhibits monocyte adhesion and reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58: 12722-8.
318. Fang H, Tong W, Shi LM, et al. Structure - Activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chemical Research in Toxicology*. 2001; 14: 280-94.
319. Channon KM, Qian H and George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: Insights from experimental gene therapy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000; 20: 1873-81.
320. Castilla P, Dávalos A, Teruel JL, et al. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 87: 1053-61.
321. Castilla P, Echarri R, Davalos A, et al. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006; 84: 252-62.
322. Kumar R, Grover S and Batish VK. Bile salt hydrolase (Bsh) activity screening of *Lactobacilli*: *In Vitro* selection of indigenous *Lactobacillus* strains with potential bile salt hydrolysing and cholesterol-lowering ability. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2012: 1-11.
323. Homayouni A, Payahoo L and Azizi A. Effects of probiotics on lipid profile: A review. *American Journal of Food Technology*. 2012; 7: 251-65.
324. Randhawa KM, Bhatia A, Chugh C and Jasrotia K. The synergistic hypocholesterolaemic and immunomodulatory effect of two probiotic strains *in vivo*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2011; 5: 312-5.